

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES.**

**TEMA:
ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA RÁPIDA
DETECCIÓN DEL GEN *bla-KPC* EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS
RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS MEDIANTE EL USO DE LAMP
(LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION)**

**AUTOR:
ALEJANDRO PASPUEZAN RONNY RICARDO**

**TUTORA:
GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ**

Quito, febrero de 2019

Cesión de derechos de autor

Yo Ronny Ricardo Alejandro Paspuezan con documento de identificación No. 1718327172 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Estandarización de un protocolo para la rápida detección del gen *bla-KPC* en bacterias Gramnegativas resistentes a carbapenémicos mediante el uso de LAMP (Loop mediated isothermal amplification)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Ronny Ricardo Alejandro Paspuezan

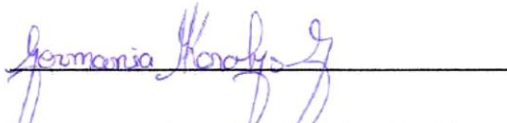
Cédula: 1718327172

Quito, febrero de 2019.

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Estandarización de un protocolo para la rápida detección del gen *bla-KPC* en bacterias Gramnegativas resistentes a carbapenémicos mediante el uso de LAMP (Loop mediated isothermal amplification), realizado por Ronny Ricardo Alejandro Paspuezan, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser, considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero de 2019.



Germania Margarita Karolys Gutiérrez

CI: 1708492499

Dedicatoria

A mi familia, por la paciencia de todos estos años,
¡Lo logramos!

Agradecimientos

Tengo que agradecer a todos y cada una de las personas que estuvieron a lo largo de este camino, quiero agradecerles por su tiempo, por las experiencias vividas, por el conocimiento compartido, por su amistad, por su cariño y por su sinceridad.

Tengo que agradecer de manera especial al TEAM RAM, quienes demostró ser un grupo de amigos y profesionales increíble, gracias por haberme permitido ser parte de eso, gracias también por su ayuda, asesoría, y sobre todo la paciencia durante el desarrollo de este proyecto. Así mismo extendiendo mis agradecimientos para el Dr. Gabriel Morey y el Dr. Antonio Vallecillo por haberme ayudado en aquellos momentos de incertidumbre y frustración, sus recomendaciones, sugerencias y consejos fueron de mucha ayuda en la culminación de este proyecto.

Un agradecimiento especial para Germania Karolys y Fernando Villavicencio por depositar su confianza en mí y haberse arriesgado a realizar este proyecto.

Por último, pero no menos importante tengo que agradecer a mis padres que siempre confiaron en que lo iba a lograr.

¡Lo logramos!

No hay mejor aprendizaje que errar todo lo necesario.

Seba Zappeltini

Gracias a todos.

Índice de contenidos

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco Conceptual	4
1.1 Resistencias antibióticas.....	4
1.2 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	5
1.1.1 Bombas de expulsión activa:.....	6
1.1.2 Modificación de la permeabilidad de la membrana externa:	6
1.1.3 Alteración de las proteínas fijadoras de penicilina PBP:	6
1.1.4 Modificación enzimática del antibiótico.....	7
1.1.4.1 Betalactamasas.	7
1.1.4.2 Clasificación de Betalactamasas.	8
1.1.4.3 Carbapenemasas.	9
1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa (KPC).	12
1.3.1 Métodos fenotípicos y métodos moleculares.	14
1.3.1.1 Antibiograma.....	14
1.3.1.2 Método basado en la inhibición por Ac. 3-fenil-Borónico (ABP). ..	14
1.3.1.3 Método de Inactivación del Carbapenémico (CIM).....	15
1.3.1.4 Test Carba NP (CNP).	15
1.3.1.5 Métodos espectrofotométricos.....	16
1.3.1.6 Espectrometría de masas MALDI-TOF.	16

1.3.1.7	Técnicas inmunocromatográficas.....	16
1.3.1.8	Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE).	17
1.3.1.9	Multilocus Sequence Typing (MLST).	17
1.3.1.10	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	18
1.3.1.11	Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).	19
1.4	Enterobacterias resistentes a los antibióticos.	20
Capítulo 2	25
Materiales y métodos	25
2.1	Selección de Cepas bacterianas.	25
2.1.1	Reactivación de Cepas bacterianas.	25
2.2	Estandarización del protocolo de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).	26
2.2.1	Análisis de oligonucleótidos LAMP mediante alineamiento a secuencias del gen <i>bla-KPC</i> de interés.....	27
2.2.2	Pre-mezcla de reacción.	29
2.2.3	Gradiente de Temperatura.....	31
2.2.4	Gradiente de concentración de oligonucleótidos.	32
2.2.5	Gradiente de concentración del donador de Mg^{+2}	33
2.2.6	Gradiente de concentración de dNTPs.	34
2.2.7	Gradiente de concentración de betaína.	35
2.2.8	Calidad de la Muestra.....	35
2.2.8.1	Ensayo LAMP con ADN extraído por Kit.	36

2.2.8.2	Ensayo LAMP con ADN extraído por lisado térmico.....	37
2.2.8.3	Ensayo LAMP con suspensión bacteriana 0.5 McFarland.....	37
2.3	Evaluación de la capacidad diagnóstica de LAMP.	38
2.3.1	Determinación de la especificidad de LAMP.	38
2.3.2	Determinación de la sensibilidad de LAMP.	40
2.4	Análisis e Interpretación de resultados.....	42
Capítulo 3	44
Resultados y discusión	44
3.1	Cepas Bacterianas.....	44
3.2	Identificación de la secuencia homóloga.....	44
3.2.4	Optimización de las condiciones de amplificación LAMP.....	46
3.2.4.1	Gradiente de Temperatura.	46
3.2.4.2	Gradiente de concentración de oligonucleótidos FIP/BIP.....	47
3.2.4.3	Gradiente de concentración de donador de Mg^{2+}	49
3.2.4.4	Gradiente de concentración de dNTPs.	51
3.2.4.5	Gradiente de concentración de Betaína.	52
3.2.4.6	Calidad de la muestra.	52
3.3	Evaluación de la capacidad diagnostica de LAMP.	53
3.3.1	Determinación de la especificidad LAMP.	53
3.3.2	Determinación de la sensibilidad de LAMP.	55
3.4	Análisis e Interpretación de resultados.....	59
Conclusiones	63

Recomendaciones.....	64
----------------------	----

Bibliografía	65
--------------------	----

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana.....	5
Figura 2: Distribución de carbapenemasas clase A en la región de América latina y el caribe.....	10
Figura 3: Distribución de metalo- β -lactamasas en la región de América latina y el caribe.....	11
Figura 4: Distribución de carbapenemasas clase D reportadas en la región de América latina y el caribe.	12
Figura 5: Características estructurales del transposon Tn4401.....	13
Figura 6: Esquematación de la pared celular en bacterias Gram negativa.....	23
Figura 7: Esquematación estructural del género Enterobacteriaceae.....	23
Figura 8: Esquematación del intercambio de material genético mediado por plásmidos en enterobacterias.....	24
Figura 9: Representación esquemática de la localización y distancia entre de los oligonucleótidos LAMP.....	29
Figura 10: Preparación de diluciones seriadas a partir de una concentración conocida.	41
Figura 11: Tamaño de la región reconocida por los oligonucleótidos LAMP descritos por Srisrattakarn et al., 2017.....	45

Índice de Tablas

Tabla 1: Pre-mezcla de reacción LAMP para ensayos de gradientes de temperatura.	30
Tabla 2: Pre-mezcla de reacción LAMP bajo condiciones isotérmicas.	31
Tabla 3: Grupos de gradientes de temperatura.....	31
Tabla 4 :Grupos de gradientes de concentración de oligonucleótidos.	33
Tabla 5: Grupos de gradientes de concentración de donadores de Mg^{+2}	34
Tabla 6: Grupos de gradientes de concentración de desoxinucleótidos (dNTPs).	35
Tabla 7: Grupos de gradientes de concentración de betaína.	35
Tabla 8: Grupos de Volumen de ADN.....	36
Tabla 9: Pre-mezcla de reacción PCR para ensayos de especificidad.	39
Tabla 10: Protocolo de termociclado PCR para ensayos de especificidad.	39
Tabla 11: Condiciones de amplificación LAMP.....	42
Tabla 12: Tabla de cuatro casillas.....	43
Tabla 13: Grupo de oligonucleótidos LAMP.....	46
Tabla 14: Cuantificación de ADN.....	56
Tabla 15: Tabla de cuatro casillas, comparación de resultados de amplificación LAMP y PCR de punto final.	59

Índice de Anexos

Anexo 1: Esquema de Amplificación de ADN mediante PCR.....	84
Anexo 3: Características Bioquímicas de algunas Enterobacterias.	87
Anexo 4: Reactivos utilizados en la reacción de amplificación LAMP.....	88
Anexo 5: Grupos de oligonucleótidos LAMP.....	89
Anexo 6: Cepas bacterianas seleccionadas.	91
Anexo 7: Variantes del gen bla-KPC.	93
Anexo 8: Alineamiento de oligonucleótidos LAMP.....	94
Anexo 9: Ensayo de gradiente de Temperatura.	95
Anexo 10: Ensayo de gradiente de concentración de oligonucleótidos.....	95
Anexo 11: Ensayo de gradiente de concentración de donador de Mg ²⁺	96
Anexo 12: Ensayo de gradiente de concentración de betaína.	97
Anexo 13: Ensayo de calidad de muestra.	97
Anexo 14: Determinación de especificidad LAMP	98
Anexo 15: Determinación de especificidad PCR.....	99
Anexo 16: Alternativas para detección de productos amplificados por LAMP.....	100
Anexo 17: Comparación individual de resultados de amplificación LAMP y PCR.	101
Anexo 18: Ensayos de sensibilidad de LAMP y PCR con ADN extraído por Kit.	101
Anexo 19: Ensayos de sensibilidad de LAMP y PCR con ADN extraído por lisado térmico.....	102
Anexo 20: Ensayos de sensibilidad de LAMP y PCR usando suspensión bacteriana 0.5 McFarland.	103
Anexo 21: Sensibilidad de técnicas LAMP y PCR de punto final.....	104

Resumen

En Ecuador existe gran prevalencia de bacterias portadoras de enzimas carbapenemasas que representan el principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos betalactámicos, utilizados en el tratamiento de infecciones respiratorias, del sistema nervioso central, intraabdominales, urinarias, endocarditis y sepsis de origen no clasificado. El gen codificante para carbapenemasas, *bla-KPC-2*, es el de mayor incidencia en instituciones de salud del país, según reportes del INSPI – CZ9, Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CNR-RAM). Actualmente hospitales o centros de salud básicos carecen de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos de bajo costo, rápida detección, alta sensibilidad, especificidad y capacidad para discriminar secuencias de genes de resistencia.

Mediante esta investigación se estandarizó un protocolo para la rápida detección del gen *bla-KPC* en Enterobacterias, usando LAMP como técnica de diagnóstico clínico que pueda ser utilizada a futuro en hospitales y centros de salud básicos. Se seleccionaron del cepario del CNR-RAM, 40 cepas bacterianas: 20 positivas para *bla-KPC*; 11 cepas con diferentes genes de resistencia a carbapenémicos (*BLEE*; *bla-IMP*; *bla-NDM*; *bla-OXA-48*, *bla-Ctx-m*) y 9 que no presentaban ningún gen de resistencia, todas confirmadas previamente mediante microbiología y biología molecular. Las condiciones de amplificación de la región del gen *bla-KPC*, que permitieron obtener un amplicón de buena calidad fueron: temperatura a 63 °C, concentraciones de oligonucleótidos internos: FIP/BIP 0.4μM; MgSO₄ desde 4mM; Betaína a 0.8M; dNTPs a 0.8mM; volumen de ADN 1μL; tiempo de amplificación se estableció en 60 minutos a la temperatura indicada. LAMP presentó una alta sensibilidad y especificidad (>99%).

Palabras clave: Carbapenemasas, isotérmico, pirofosfatos, turbidez, LAMP.

Abstract

In Ecuador there is a high prevalence of bacteria carrying carbapenemase enzymes that represent the main mechanism of resistance against beta-lactam antibiotics, used in the treatment of respiratory infections, central nervous system, intra-abdominal, urinary, endocarditis and sepsis of unclassified origin. The gene coding for carbapenemases, *bla-KPC-2*, is the highest incidence in health institutions in the country, according to reports from the INSPI - CZ9, National Reference Center for Resistance to Antimicrobials (CNR-RAM). Currently hospitals or basic health centers lack a low cost nucleic acid amplification technique, rapid detection, high sensitivity, specificity and ability to discriminate resistance gene sequences.

Through this research, a protocol for the rapid detection of the *bla-KPC* gene in Enterobacteria was standardized, using LAMP as a clinical diagnostic technique that can be used in hospitals and basic health centers in the future. 40 bacterial strains were selected from the CNR-RAM strain: 20 positive for *bla-KPC*; 11 strains with different resistance genes to carbapenemics (*ESBL*, *bla-IMP*, *bla-NDM*, *bla-OXA-48*, *bla-Ctx-m*) and 9 that did not present any resistance gene, all previously confirmed by microbiology and molecular biology. The amplification conditions of the *bla-KPC* gene region, which allowed to obtain a good quality amplicon were: temperature at 63 ° C, internal oligonucleotide concentrations: FIP / BIP 0.4 µM; MgSO 4 from 4mM; Betaine at 0.8M; dNTPs at 0.8mM; DNA volume 1µL; Amplification time was established in 60 minutes at the indicated temperature. LAMP presented a high sensitivity and specificity (> 99%).

Key words: Carbapenemases, isothermal, pyrophosphates, turbidity, LAMP.

Introducción

El descubrimiento de los antibióticos en los años cuarenta del siglo XX y su introducción en la práctica clínica supuso una revolución en el campo de la medicina, salvando millones de vidas y aumentando la esperanza de vida de la población de aquella época en varios años (Alós, 2015). Aquel maravilloso descubrimiento ocasionó que los antibióticos se convirtieran en los fármacos de mayor prescripción para el tratamiento de infecciones bacterianas, sin importar que estos sean o no necesarios o los más efectivos (Frieden, 2013). El uso indebido y excesivo de estos fármacos ocasionó que muchos patógenos gram negativos, incluidos *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* desarrollen resistencia, convirtiéndose en un serio problema de salud pública a nivel mundial que continua aumentando rápidamente por el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia y por la facilidad de transmitirlos, no solo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie (Ali & Subhan, 2016; Hammoudi, Ayoub Moubareck, & Karam Sarkis, 2014; Alós, 2015; OMS, 2017).

Klebsiella pneumoniae es una bacteria gram negativa productora de enzimas carbapenemasas (KPC) que fue reportada en 1996 en Estados Unidos. *K. pneumoniae* carbapenemasa es capaz de producir enzimas β -lactamasas con alta eficiencia hidrolizando penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de β -lactámicos (Muñoz-Price *et al.*, 2013, Duan, Ge, Zhang, Wang, & Zhou, 2014, Hammoudi *et al.*, 2014). Se han reportado brotes de bacterias productoras de KPC y diversas variantes como KPC-2, KPC-3 en muchos países de Europa, Sudamérica, Asia y en menor frecuencia África (Nakano *et al.*, 2014; Muñoz-Price *et al.*, 2013; Pena, 2015; Hong *et al.*, 2013; Zurita *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016; Escandón-Vargas, Reyes, Gutiérrez, & Villegas, 2017).

Esta rápida diseminación del gen *bla-KPC* es facilitada por transferencia genética mediado por el transposón Tn44011, el cual está asociado al secuenciotipo (ST) ST258 de *K. pneumoniae*, sugiriendo que pudo haber contribuido significativamente a la propagación de los genes *bla-KPC* a nivel mundial (Cuzon, Naas, & Nordmann, 2011; Hong *et al.*, 2013; López & Almirante, 2014; Satán & Tamayo, 2016).

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos de última generación ha hecho necesario el uso de métodos moleculares rápidos, sensibles y específicos que ayuden en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Pena, 2015; Lee *et al.*, 2016; Srisrattakarn *et al.*, 2017). Técnicas moleculares como la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) ayudan en el diagnóstico clínico debido a su alto nivel de sensibilidad y especificidad lo cual hace útil su uso en numerosos ensayos de diagnóstico clínico (Notomi *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2014; Cheng, Zheng, & Rui, 2014; Del Franco *et al.*, 2015). Sin embargo, una desventaja que presenta esta técnica es su elevado costo tanto por equipos, personal calificado, espacio físico y tiempo requerido. Haciendo que la técnica no pueda ser usada en la práctica clínica de rutina de hospitales y centros de salud básicos (Notomi *et al.*, 2000; Mori, Nagamine, Tomita, & Notomi, 2001; Arroyo, Morales, Sosa, Carmona, & Maestre, 2008).

En el año 2000, Notomi *et al.*, publicaron un estudio que habla sobre una nueva y novedosa técnica molecular denominada LAMP (Loop mediated isothermal amplification) que realiza la amplificación de ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas obteniendo resultados en menor tiempo, con altos niveles de sensibilidad y especificidad, facilidad de aplicación en el diagnóstico clínico de rutina de hospitales o centros de salud básicos, facilidad de uso e interpretación, requisitos mínimos de experiencia y bajo costo (Tomita, Mori, Kanda, & Notomi, 2008; Cheng *et al.*, 2014;

Sánchez *et al.*, 2014; Sema *et al.*, 2015; Wong, Othman, Lau, Radu, & Chee, 2017).

La técnica LAMP se ha convertido en una buena opción de rápida detección de genes de resistencia a carbapenémicos tales como: *bla-NDM*, *bla-IMP*, *bla-VIM*, *bla-OXA-48* y *bla-KPC* (Solanki *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014; Nakano *et al.*, 2014; Srisrattakarn *et al.*, 2017).

El objetivo del presente trabajo es Estandarizar un Protocolo para la rápida detección del gen *bla-KPC* en bacterias Gramnegativas resistentes a carbapenémicos mediante el uso de LAMP (Loop mediated isothermal amplification).

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1 Resistencias antibióticas.

La resistencia es un problema continuo y en aumento que se hace mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y tiene la capacidad de transmitirlo a su descendencia, a otras bacterias de la misma o diferente especie; limitando las opciones terapéuticas y elevando el coste sanitario (mayor consumo de recursos) (Papp-Wallace *et al.*, 2011; Woodford, Turton, & Livermore, 2011; Fariñas & Martínez, 2013; Frieden, 2013). Estos microorganismo se clasifican según el número de antibióticos que resisten por familia: Multidrogo-resistente (MDR) cuando presenta resistencia combinada a 3 clases de antimicrobianos, Extensivamente-resistente (XDR) cuando la opción terapéutica se reduce a 2 o 3 antimicrobianos como tratamiento y Panresistentes (PDR) cuando el microorganismo es resistente a todos los antimicrobianos actuales (Magiorakos *et al.*, 2011; Fariñas & Martínez, 2013). Entre las principales causas que generan la resistencia están la aparición de genes de resistencia los cuales surgen cuando el antibiótico inhibe o mata las bacterias silvestres sensibles, pero no afecta a los pocos individuos que por mutación espontánea adquirieron un alelo resistente, sobreviviendo y multiplicándose hasta convertirse en los más prevalentes (Beceiro, Tomás, & Bou, 2012). De esta manera algunos genes de resistencia denominados “resistoma”, pueden diseminarse a través de elementos genéticos eficaces y por medio de mecanismos habituales de transferencia genética, principalmente conjugación, aunque también por transformación y transducción, tanto a bacterias comensales como patógenas de humanos y animales. Otra causa es el uso inadecuado de antimicrobianos (Muñoz-Price *et al.*, 2013; Alós, 2015; Satán & Tamayo, 2016).

1.2 Mecanismos de resistencia bacteriana.

El fenómeno de resistencia antimicrobiana es un proceso natural que ha ido evolucionando de forma acelerada desde la implementación de los antimicrobianos en medicina por parte del ser humano. Esto ha obligado a los microorganismos a adaptarse desarrollando o adquiriendo diversos mecanismos de resistencia generando un impacto en la salud humana, al reducir las opciones terapéuticas para tratar infecciones bacterianas (Suárez & Gudiol, 2009; Beceiro, Tomás, & Bou, 2012; Martínez, 2014; Cubero, 2015; Pena, 2015; Lee *et al.*, 2016; Escandón-Vargas, Reyes, Gutiérrez, & Villegas, 2017). Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales (Fig.1).

Principales mecanismos de resistencia antibacteriana

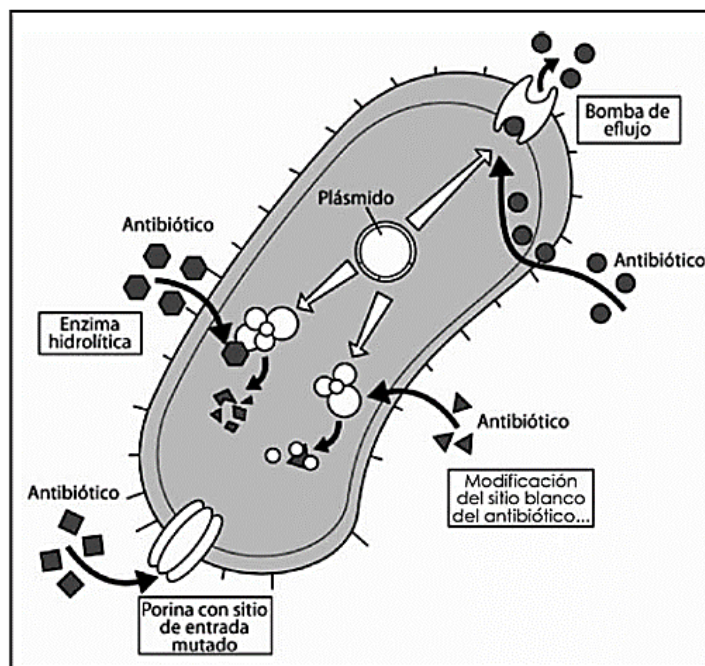


Figura 1: Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana.

Tomado de: (Moreno, González, & Beltrán, 2009) *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios*.

1.1.1 Bombas de expulsión activa:

Son bombas de eflujo dependientes de energía capaces de expulsar del citoplasma y periplasma compuestos tóxicos para la bacteria como metabolitos, detergentes solventes orgánicos y antibióticos. Bombas de expulsión como OqxAB has sido detectadas en varas especies de la familia *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. aerogenes* y *E. cloacae*). Su expresión puede ser permanente o inducida (Marín & Gudiol, 2003; Suárez & Gudiol, 2009; Cox & Wright, 2013; Moreno, 2013; Cubero, 2015; Sekyere, Govinden, & Essack, 2015; Gómara-Lomero *et al.*, 2017).

1.1.2 Modificación de la permeabilidad de la membrana externa:

Los antibióticos betalactámicos tienen características hidrofóbicas que dificultan su entrada a través de la membrana externa de bacilos gram negativos (Marín & Gudiol, 2003). Debido a esto los betalactámicos usan canales llamados porinas que facilitan el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas hacia el espacio periplásmico y luego a su sitio blanco. El mecanismo de resistencia se da cuando las bacterias mutan produciendo porinas no funcionales o reduciendo el número de porinas de tal manera que la cantidad de carbapenémico que llega al espacio periplásmico disminuye considerablemente generando fenotipos de resistencia (Suárez & Gudiol, 2009; Cox & Wright, 2013; Moreno, 2013; Del Franco *et al.*, 2015; Pena, 2015; Sekyere, Govinden, & Essack, 2015).

1.1.3 Alteración de las proteínas fijadoras de penicilina PBP:

Mediante modificaciones estructurales se impide que los antibióticos betalactámicos puedan interactuar sobre el sitio blanco, lo que provoca una pérdida de afinidad por

las PBPs sin que estas pierdan funcionalidad dentro de la célula bacteriana. La hiperproducción de PBPs también puede disminuir el efecto de los betalactámicos debido a la insuficiente cantidad de moléculas para saturar el exceso de PBPs producidas. (Marín & Gudiol, 2003; Suárez & Gudiol, 2009; Moreno, 2013; Cubero, 2015; Pena, 2015).

1.1.4 Modificación enzimática del antibiótico.

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico, las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico inactivando el antibiótico antes que pueda unirse a las PBP. Las betalactamasas con mayor frecuencia son las AmpC y las carbapenemasas. También existen enzimas capaces de modificar antibióticos por reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación. (Marín & Gudiol, 2003; Tafur, Torres, & Villegas, 2008; Suárez & Gudiol, 2009; Moreno, 2013; Cubero, 2015; Del Franco *et al.*, 2015; Pena, 2015; Gómara-Lomero *et al.*, 2017).

1.1.4.1 Betalactamasas.

Representan el principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos betalactámicos especialmente en la familia *Enterobacteriaceae* (Satán & Tamayo, 2016; Escandón-Vargas *et al.*, 2017). Su mecanismo de acción consiste en hidrolizar el anillo betalactámico inactivando el antibiótico antes de que pueda unirse a la PBP (penicillin binding proteins) (Marín & Gudiol, 2003; Hammoudi, Ayoub Moubareck, & Karam Sarkis, 2014; Del Franco *et al.*, 2015; Jeon *et al.*, 2015).

Su producción está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones (Marín & Gudiol, 2003; Sekyere, Govinden, & Essack, 2015). Las betalactamasas cromosómicas, son producidas fundamentalmente por bacterias gram negativas, las cuales pueden ser constitutivas (siempre en producción) o inducibles (solo en presencia del betalactámico).

La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias de igual o diferente especie (Suárez & Gudiol, 2009; Cox & Wright, 2013).

1.1.4.2 Clasificación de Betalactamasas.

La producción de betalactamasas es el mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos más importante por su frecuencia y eficacia (Pena, 2015). Ambler en 1980 propuso la primera clasificación de β -lactamasas en base a la secuencia de aminoácidos de las enzimas, dando como resultado cuatro clases: A,B,C y D (Vignoli & Seija, 2000; Cubero, 2015; Nakano *et al.*, 2014; Satán & Tamayo, 2016). Las β -lactamasas de los grupos A, C, D, necesitan moléculas de serina en su centro activo para hidrolizar penicilinas, cefalosporinas (3ra y 4ta generación), monobactámicos, y carbapenémicos. La clase B son dependientes de metales como el zinc para su funcionamiento, hidrolizando todos los β -lactámicos con excepción de monobactámicos (Tafur, Torres, & Villegas, 2008; Moreno, 2013; Cubero, 2015; Pena, 2015; Satán & Tamayo, 2016; Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

1.1.4.3 Carbapenemasas.

Las carbapenemasas representan la familia de betalactamasas más versátil, con un amplio espectro (Livermore, 2012). Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los betalactámicos (Pena, 2015). Según su mecanismo hidrolítico, estas enzimas se agrupan en tres clases: clase A (penicilinasas), clase B (metaloenzimas) y de clase D (oxacilinasas). La clase A y D poseen un centro activo de serina, mientras que las enzimas de clase B requieren zinc como cofactor (Livermore, 2012; Cubero, 2015; Pena, 2015; Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

Las carbapenemasas de clase A incluyen a las familias IMI (Imipenem hydrolyzing β -lactamase), NMC-A (Non metallo carbapenemase of class A) y SME (*Serratia marcescens* enzyme) codificadas por cromosoma, mientras que KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), BKC (Brazilian *Klebsiella* carbapenemase) y GES (Guiana extended spectrum β -lactamase) son codificadas por plásmidos. La familia de mayor importancia epidemiológica es *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa “KPC” reportada en varias partes del mundo, América latina y el caribe (Fig. 2). (Calvo, Cantón, Fernández-Cuenca, Mirelis, & Navarro, 2011; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Hong *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016; AlTamimi, AlSalamah, AlKhulaifi, & AlAjlan, 2017; Bush, Palzkil, & Jacoby, 2017; Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

Familias de carbapenemasas reportadas en América latina y el caribe

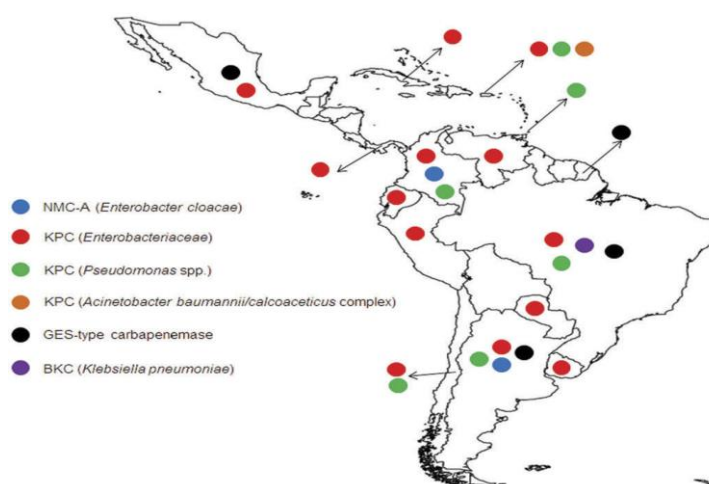


Figura 2: Distribución de carbapenemasas clase A en la región de América latina y el caribe.

En América latina y el caribe las enzimas carbapenemasas han sido reportadas en varias enterobacterias de las cuales la de mayor frecuencia son NMC-A, KPC, GES y BKC.

Tomado de: (Escandón-Vargas *et al.*, 2017) *The epidemiology of carbapenemases en Latin America and the Caribbean*.

La clase B tiene más diversidad a nivel molecular, incluye a las familias IMP (Imipenemase), VIM (Verona integron encoded metallo- β -lactamase), NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), GIM (German imipenemase) y SIM (Seoul imipenemase) todas forman parte de genes *cassette* en integrones de clase 1, por lo que pueden ser codificadas en el cromosoma o en plásmidos. Entre las metalo- β -lactamasas con más prevalencia en el mundo están VIM y NDM. En américa latina y el caribe las familias de metalo- β -lactamasas reportadas con mayor frecuencia son IMP, VIM, NDM y SPM (Fig. 3) (Calvo *et al.*, 2011; Livermore, 2012; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Moreno, 2013; Pena, 2015; Altamimi *et al.*, 2017; Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

Familias de metalo- β -lactamasas reportadas en América latina y el caribe

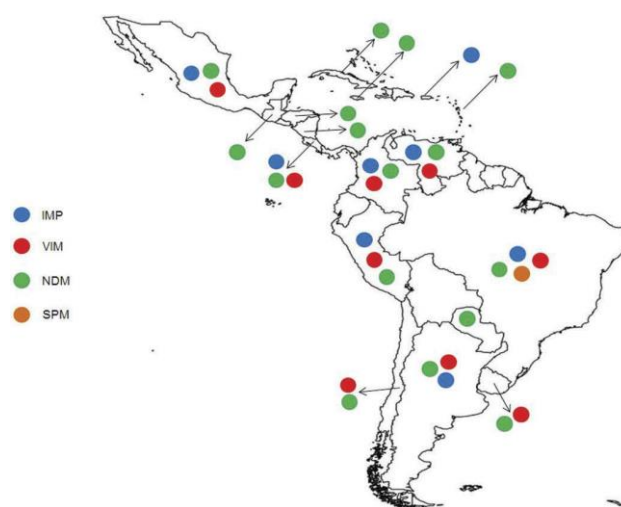


Figura 3: Distribución de metalo- β -lactamasas en la región de América latina y el caribe.

Las familias de metalo- β -lactamasas reportadas con mayor frecuencia en américa latina y el caribe se encuentran IMP, VIM, NDM y SPM.

Tomado de: (Escandón-Vargas *et al.*, 2017) *The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean*.

Las carbapenemasas de clase D llamadas también oxacilinasas se dividen en varios subgrupos: OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58 y OXA-143. Estas enzimas llamadas CHDLs (del inglés carbapenem hydrolyzing class D β -lactamasas), pueden ser codificados por genes presentes en el cromosoma o en plásmidos y son detectadas principalmente en *A. baumannii* pero también en varias familias de enterobacterias alrededor del mundo (Tafur *et al.*, 2008; Moreno, 2013; Pena, 2015; ALTamimi *et al.*, 2017; Escandón-Vargas *et al.*, 2017). Aquellos plásmidos que contienen genes *bla-OXA-48* están relacionados con secuencias de inserción IS1999, IS4 y ISAbal1 responsables en la movilización y expresión de genes de resistencia a betalactámicos (Calvo *et al.*, 2011; Pena, 2015; Escandón-Vargas *et al.*, 2017). En la región de américa latina y el caribe, aparte de OXA-51 que está presente típicamente en *A. baumannii* se han identificado varios subgrupos de carbapenemasas clase D (Fig. 4).

Familias de carbapenemasas clase D reportadas en América latina y el caribe

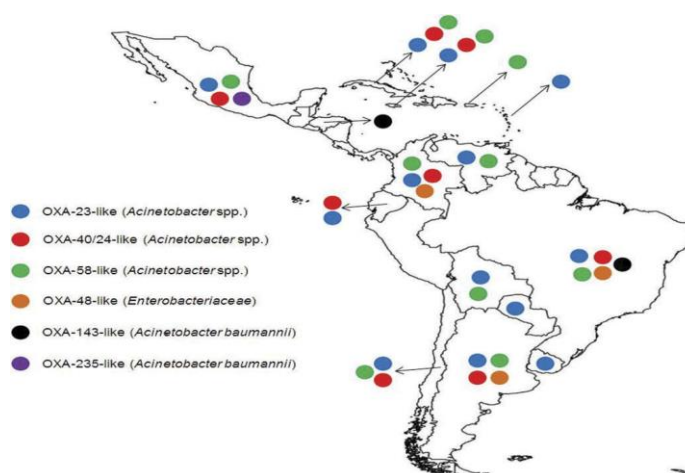


Figura 4: Distribución de carbapenemasas clase D reportadas en la región de América latina y el caribe.

A parte de OXA-51 relacionada típicamente con *A. baumannii*, seis subgrupos CHDLs han sido identifiacados en américa latina y el caribe.

Tomado de: (Escandón-Vargas *et al.*, 2017). The epidemiology of carbapenemases en Latin America and the Caribbean.

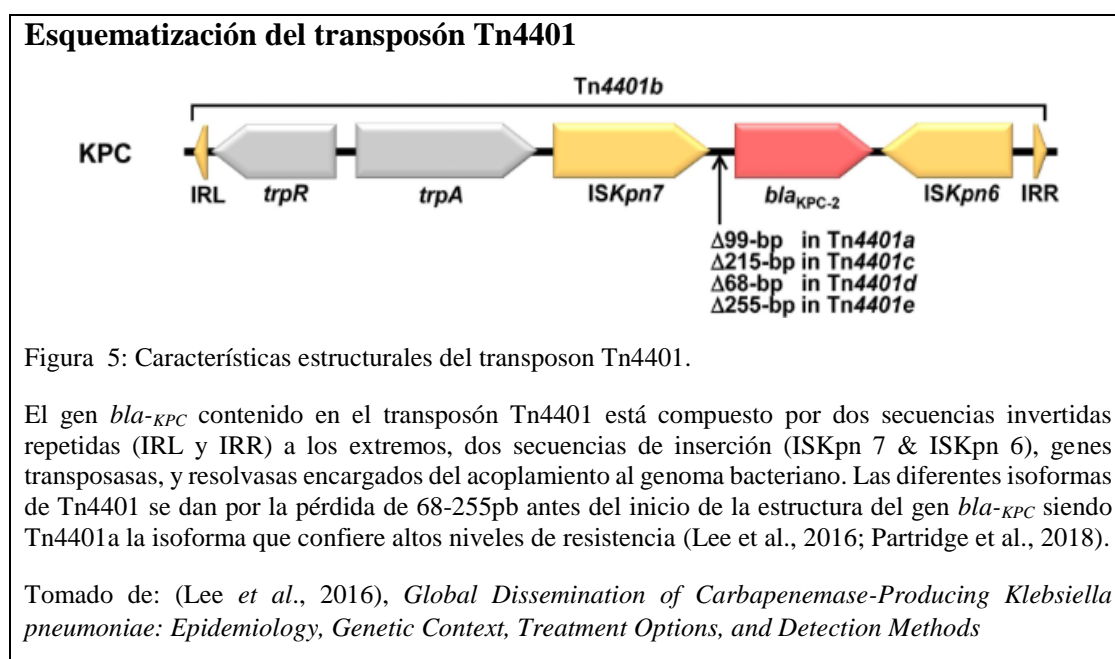
1.3 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

Klebsiella pneumoniae carbapenemasa “KPC”, es la enzima más prevalente de carbapenemasas clase A, fue reportada por primera vez en los Estados Unidos en 1996 y desde entonces su frecuencia ha ido en aumento. Actualmente presenta diferentes variantes (KPC-2 – KPC-24) que difieren una de otra por la sustitución de uno o tres aminoácidos, sin embargo, las más caracterizadas son KPC-2 y KPC-3 asociadas a la secuencia tipo (ST) 258 de *K. pneumoniae* distribuida alrededor del mundo (Cuzon, Naas, & Nordmann, 2011; Woodford, Turton, & Livermore, 2011; Livermore, 2012; López & Almirante, 2014; Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

Mediante el uso de plásmidos conjugativos, los genes de resistencia han logrado diseminarse a todo el mundo, de los cuales los tipos IncFII_{K2}, IncN, IncFIA han sido

reportados con frecuencia como portadores del transposón Tn4401, principal responsable de la transmisión del gen *bla-KPC* en varias especies de enterobacterias alrededor del mundo (Carattoli, 2009; Gootz *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2011; Carattoli, 2013; Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

Tn4401 tiene un peso de 10 kb, está delimitado por 2 secuencias repetidas inversas de 39 pb (IRL y IRR), dos secuencias de inserción (*ISKpn6*, *ISKpn7*) que se acoplan al genoma de la bacteria receptora, provocando la producción enzimática (Fig. 5) (Gootz *et al.*, 2009; Cuzon, Naas, & Nordmann, 2011; Carattoli, 2013; Lee *et al.*, 2016). Actualmente se conocen cinco isoformas que difieren por la delección de 68-225 pb, justo antes del inicio del gen *bla-KPC* (Fig.5) (Tn4401a delección de 99pb, Tn4401b no presenta delección, Tn4401c delección de 215 pb, Tn4401d delección de 68 pb, Tn4401e delección de 255 pb), siendo Tn4401a la isoforma con más altos niveles de resistencia asociada a la secuencia tipo ST258 alrededor del mundo (Lee *et al.*, 2016; Partridge, Kwong, Firth, & Jensen, 2018).



La detección de bacterias portadoras de enzimas carbapenemasas de tipo KPC ha sido de vital importancia en los últimos años tanto para el control como para la prevención de la diseminación de este tipo de resistencias, existen diferentes métodos de detección e identificación para este tipo de enzimas los más comúnmente utilizados por varios laboratorios son:

1.3.1 Métodos fenotípicos y métodos moleculares.

Mediante métodos fenotípicos y moleculares se puede evidenciar la producción de enzimas carbapenemasas de una cepa, estos métodos son de referencia y tienen la capacidad de detectar nuevas carbapenemasas además de las conocidas, además, de discriminar cepas con o sin relación a través de diferencias moleculares (Cubero, 2015; Pena, 2015; Satán & Tamayo, 2016; March-Rosselló, 2017).

1.3.1.1 Antibiograma.

El antibiograma se usa para determinar la sensibilidad de un microorganismo ante un antibiótico. Usando varios discos de antibióticos con concentración conocida [μg] se expone a la bacteria inoculada previamente en Agar Mueller Hinton, con la finalidad de ver el efecto del antibiótico sobre esta, los resultados se expresan mediante halos de inhibición que son interpretados bajo los criterios del CLSI (Satán & Tamayo, 2016).

1.3.1.2 Método basado en la inhibición por Ac. 3-fenil-Borónico (ABP).

Este método es utilizado para detectar carbapenemasas de clase A, consiste en colocar de manera horizontal un disco estéril impregnado de 6 μL de ácido 3-Fenil Borónico

y dos discos de carbapenémicos (imipenem y meropenem) a una distancia de 2 cm, luego de incubar se puede evidenciar si hay o no sinergia entre los carbapenémicos y el Ac. 3-Fenil Borónico, si existe sinergia se demuestra la presencia de una enzima carbapenemasa de clase A (Hammoudi, Ayoub Moubareck, & Karam Sarkis, 2014; Pena, 2015; Satán & Tamayo, 2016). Presenta algunas limitaciones en especies de enterobacterias productoras de AmpC (*Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *M. morganii*, *Providencia spp*, *Serratia spp*.) ya que el Ac. 3-Fenil Borónico también las afecta, por lo que se recomienda combinarlo con cloxacilina para poder diferenciar carbapenemasas de clase A y AmpC (Hammoudi *et al.*, 2014; Pena, 2015; Sekyere *et al.*, 2015).

1.3.1.3 Método de Inactivación del Carbapenémico (CIM).

Consiste en realizar una suspensión bacteriana de la cepa sospechosa de producir carbapenemasas y añadirle un disco de carbapenémico (imipenem o meropenem), luego de un periodo de incubación se evalúa la inactivación del antibiótico colocándolo sobre una placa de Agar Mueller-Hinton inoculada con una cepa *E. coli* ATCC 25922 sensible, si se genera un halo cerrado es un resultado positivo a la producción de carbapenemasas (Satán & Tamayo, 2016).

1.3.1.4 Test Carba NP (CNP).

Tiene la capacidad de detectar y diferenciar carbapenemasas de clase A y B, se basa en la hidrólisis *in vitro* del imipenem que se detecta por un cambio de pH generando un resultado cualitativo (cambio de color de rojo a amarillo/naranja) (Hammoudi *et al.*, 2014; Sekyere *et al.*, 2015).

1.3.1.5 Métodos espectrofotométricos.

Método usado para detectar y diferenciar carbapenemasas en gram negativos usando la hidrólisis de imipenem por parte de carbapenemasas cultivadas en caldo, que es medida a una longitud de onda de 297 nm, permitiendo diferenciar varios tipos de carbapenemasas de otras enzimas (Hammoudi *et al.*, 2014; Sekyere *et al.*, 2015).

1.3.1.6 Espectrometría de masas MALDI-TOF.

La espectrofotometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) es un método reciente usado en laboratorios de microbiología clínica para identificar bacterias, lavaduras y hongos filamentosos, mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias creando un espectro específico para cada especie (Zárate, Romano, Nieves, & Smayevsky, 2014; Sekyere *et al.*, 2015). Mediante MALDI-TOF se puede evaluar la presencia de enzimas que hidrolizan antibióticos como carbapenemasas, para lo cual los microorganismos son incubados por un periodo de tiempo junto con el antibiótico, si se produce la degradación del antibiótico se observará la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y aparecerán nuevos picos que corresponden a los metabolitos secundarios producto de la hidrólisis del antibiótico (Hammoudi *et al.*, 2014; Sekyere *et al.*, 2015; March-Rosselló, 2017).

1.3.1.7 Técnicas inmunocromatográficas.

Se basa en una reacción inmunológica que se lleva a cabo en papel cromatográfico por acción capilar, y dos tipos de anticuerpos específicos contra un antígeno (molécula de carbapenemasa). Consiste en realizar una suspensión bacteriana usando un diluyente

para luego colocar un par de gotas en el extremo del papel, las bacterias por capilaridad se desplazarán hacia el otro extremo, si, al pasar por el anticuerpo inmovilizado en el papel hay un cambio de color la reacción es positiva (Hammoudi *et al.*, 2014; March-Rosselló, 2017).

1.3.1.8 Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE).

La electroforesis en campo pulsado PFGE por sus siglas en inglés, es una de las técnicas “*Gold standard*” en estudios de epidemiología que se usa para rastrear e investigar brotes infecciosos. Consiste en una macro-restricción utilizando enzimas de restricción que reconocen sitios específicos del ADN bacteriano, separando fragmentos de ADN con alto peso molecular (100b - 10Kb), los cuales van a migrar en un gel de agarosa impulsados por campos eléctricos que pueden o no ser constantes y que pueden cambiar de forma alterna formando pulsos. Los resultados se visualizan como un perfil de bandas que al ser comparadas permiten establecer una relación epidemiológica entre los aislamientos (López-Gomollon & Esteban Nicolas, 2013; Cubero, 2015; Satán & Tamayo, 2016).

1.3.1.9 Multilocus Sequence Typing (MLST).

Es una técnica de tipificación bacteriana basada en la secuenciación de ADN, que consiste en detectar pequeñas variaciones en los locus de genes “*housekeeping*”, estudiando regiones altamente conservadas (450-500 pb). Estas variaciones permiten determinar si los microorganismos analizados son idénticos “Clones” o altamente relacionados “líneas clonales”, esto hace que sea una herramienta útil dentro de

laboratorios de investigación y como referencia para el conocimiento y control de enfermedades (Cubero, 2015; Satán & Tamayo, 2016).

1.3.1.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR, del inglés Polimerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1985 que consiste en simular la replicación celular realizando una mezcla de ADN con fragmentos a amplificar, ADN polimerasa, iniciadores (fragmentos de ADN sintético de 15-30 nucleótidos con el extremo 3' libre para iniciar la transcripción) (Anexo 1), desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio (MgCl₂), y una solución amortiguadora que mantenga el pH para que se pueda realizar la síntesis (Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2008; Álvarez-Fernández, 2013; Bolivar, Rojas, & Garcia-lugo, 2014).

Esta mezcla se somete a un ciclo de diferentes temperaturas que se repite varias veces obteniendo *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula, los resultados se observan mediante electroforesis en geles de agarosa visualizando una banda fluorescente bajo luz UV debido al uso de intercaladores de ADN (Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2008; Ferrer, 2015). Esta técnica ha tomado mucha importancia en el diagnóstico clínico debido a su alto nivel de sensibilidad y especificidad para identificar variantes de carbapenemasas (*bla-VIM*, *bla-KPC*, *bla-NDM*, *bla-OXA*) (Hammoudi *et al.*, 2014; Satán & Tamayo, 2016).

1.3.1.11 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

La Amplificación isotérmica mediada por bucle (del inglés Loop mediated isothermal amplification) fue reportada por primera vez por Notomi *et al.* (2000); es una poderosa técnica de amplificación de ácidos nucleicos que trabaja en condiciones isotérmicas (baño maría/termobloque) obteniendo resultados en menor tiempo, con altos niveles de sensibilidad y especificidad (Notomi *et al.*, 2000; Mori, Nagamine, Tomita, & Notomi, 2001; Motamedi, Saghafinia, Karami, & Gill, 2011; Sánchez *et al.*, 2014; Wong, Othman, Lau, Radu, & Chee, 2017).

La técnica se basa en el uso de ADN polimerasa *Bst* proveniente de *Geobacillus stearothermophilus* y otras especies de *Geobacillus*, tiene alta actividad de desplazamiento de cadena larga, junto con un grupo de cuatro a seis primers (2 externos F3/B3; 2 internos FIP/BIP y 2 de bucle FLP/BLP) (Anexo 2a), los cuales reconocen ocho sitios del ADN diana, su especial diseño hace que la síntesis de ADN se realice de manera automática (Anexo 2b.), llegando a generar 10^9 copias en menos de una hora (Anexo 2c.) (Notomi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2001; Motamedi, Saghafinia, Karami, & Gill, 2011; Chuva, 2017; Wong *et al.*, 2017). Además, a la mezcla de reacción se añade desoxinucleótidos (dNTPs), betaina, sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y una solución amortiguadora para mantener el pH durante el proceso de síntesis (Mori *et al.*, 2001; Njiru, 2012; Sánchez *et al.*, 2014). La mezcla se lleva a 65 °C de temperatura por una hora, los resultados se pueden detectar por varios métodos: detección visual por turbidez: debido a la liberación de pirofosfatos durante el proceso de amplificación se genera una turbidez blanca que se aprecia a simple vista lo que indica la presencia del gen de interés (Mori *et al.*, 2001), detección visual por fluorescencia: la amplificación genera subproductos como los iones pirofosfato, los cuales se unirán y quitarán iones manganeso de la calceína para irradiar fluorescencia,

lo que puede indicar la presencia del gen de interés (Tomita *et al.*, 2008), detección visual por otras sustancias; al añadir un colorante fluorescente (bromuro de etidio, etc.) al producto amplificado y exponerlo bajo luz UV se verá fluorescente si existe la presencia del gen blanco, por cambio de color mediante un indicador de ion metal: hidroxinaftol azul. (Notomi *et al.*, 2000; Njiru, 2012; Duan, Ge, et al., 2014; Tanner & Evans, 2014; Sánchez *et al.*, 2014; Fischbach, Xander, Frohme, & Glokler, 2015; Tanner, Zhang, & Evans, 2015; Itonaga *et al.*, 2016). Visualización de resultados por electroforesis en geles de agarosa: la amplificación LAMP genera estructuras de diversos tamaños que se observan como un bandeo fluorescente bajo luz UV debido al uso de intercaladores de ADN (Notomi *et al.*, 2000; Martzy *et al.*, 2017).

La técnica LAMP se ha convertido en una buena opción de rápida detección de genes de resistencia a carbapenémicos tales como: *bla-NDM*, *bla-IMP*, *bla-VIM*, *bla-OXA-48* y *bla-KPC* (Solanki *et al.*, 2013; Cheng et al., 2014; Hammoudi *et al.*, 2014; Nakano *et al.*, 2014; Srisrattakarn *et al.*, 2017).

1.4 Enterobacterias resistentes a los antibióticos.

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos con importancia clínica. Pertenecen al dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria y orden Enterobacteriales (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy). Se han clasificado más de 47 géneros de las cuales menos de 20 especies son responsables del 95% de las infecciones (Pena, 2015). Son microorganismos con una amplia distribución ecológica: agua, suelo, plantas, microbiota intestinal de muchos animales y humanos (Fariñas & Martínez, 2013; Satán & Tamayo, 2016).

Especies de los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* superan rápidamente los mecanismos de defensa del huésped sano produciendo enfermedad siempre que infectan, por lo que se los denomina patógenos primarios (Fariñas & Martínez, 2013). Otras especies forman parte de la microbiota habitual en el ser humano sin provocar enfermedad, aportando ventajas como, por ejemplo: participando en la síntesis de vitaminas, siendo antagonistas de elementos carcinógenos. Sin embargo, cuando el sistema inmunitario del huésped presenta un debilitamiento producen daño, alojándose en zonas anatómicas estériles provocando infecciones respiratorias, urinarias, neumonías, etc., convirtiéndose en patógenos oportunistas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* y *Morganella morganii* entre otras) (De la Rosa, Prieto, & Navarro, 2011; Livermore, 2012; Pena, 2015). En los hospitales existen cepas endémicas (multirresistentes) capaces de colonizar pacientes rápidamente causando importantes infecciones intrahospitalarias debido a la facilidad con la que pueden adquirir y compartir material genético, como elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, casetes de genes e integrones), los cuales juegan un rol importante en la transferencia de genes de resistencia, incrementando la población de bacterias multirresistentes (Ali & Subhan, 2016; Satán & Tamayo, 2016).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos en forma de bastón, por lo general de 1 a 3µm de largo por 0,5µm de diámetro, proliferan en medios aerobios o anaerobios (son anaerobios facultativos), la capacidad de fermentar glucosa permite diferenciar entre géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, en medios selectivos como agar MacConkey se puede observar colonias lisas, circulares y de color rosado de cepas como: *Klebsiella spp.*, *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.*,

Citrobacter spp., *Serratia spp.* (Anexo 3) (Satán & Tamayo, 2016). A diferencia de cepas no fermentadoras de glucosa como: *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, o *Yersinia spp* que presentan colonias incoloras en agar MacConkey. Son catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrilo (Anexo 3). El contenido de G/C del ADN total está entre 38 a 60 moles % (Algorta, 2001; Puerta & Mateos, 2010; Tobergte & Curtis, 2013).

Al igual que otras bacterias Gram negativas, las enterobacterias presentan una envoltura celular que se caracteriza por una estructura multilaminar. Una membrana interna (citoplasmática), formada por una doble capa de fosfolípidos que regulan el paso de nutrientes, metabolitos, macromoléculas y recubierta de una fina capa de peptidoglicano. Una membrana externa compleja que comprende la cápsula formada por una doble capa de fosfolípidos que contiene **lipopolisacáridos** (LPS) un importante factor de virulencia con tres dominios principales: 1) Lípido A (Endotoxina), 2) oligosacárido fosforilado central (núcleo) y 3) cadenas laterales de oligosacárido de repetición que unido al LSP forman el antígeno O (base para la clasificación de los serogrupos) (Fig. 7). También presenta **porinas** que son canales empleados para la penetración de antibióticos y nutrientes (Puerta & Mateos, 2010; Livermore, 2012). Debido a la presencia de organelas complejas que irradian hacia el exterior de la membrana externa como **flagelos**, algunas enterobacterias pueden presentar motilidad (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*), aunque también existen enterobacterias sin motilidad (*Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*).

Estructura multilaminar de bacterias Gram negativas

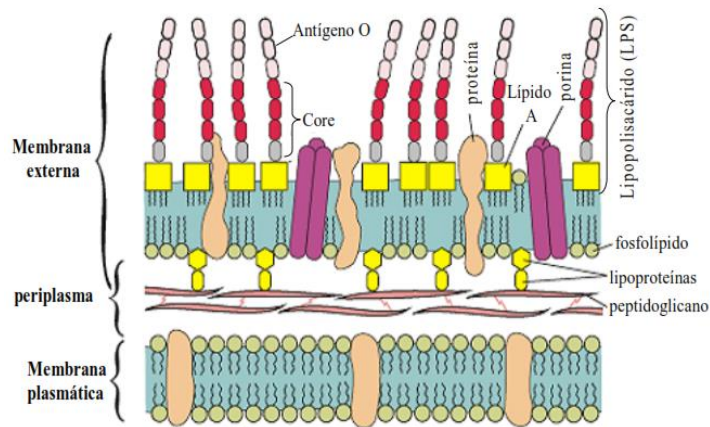


Figura 6: Esquemización de la pared celular en bacterias Gram negativa.

Tomado de: (Aquili, 2009) “*Caracterización de cepas de Escherichia coli con fenotipos de multirresistencia inducidos o seleccionados in vitro con antimicrobianos o con fármacos no antimicrobianos*”.

Las fimbrias o ***pili***, estructuras basales de la membrana interna con forma de filamentos cortos, rígidos y muy finos (no visibles al microscopio) que permiten la adhesión de la bacteria a la célula huésped (Fig. 8) (Tobergte & Curtis, 2013; Satán & Tamayo, 2016).

Estructura del género *Enterobacteriaceae*

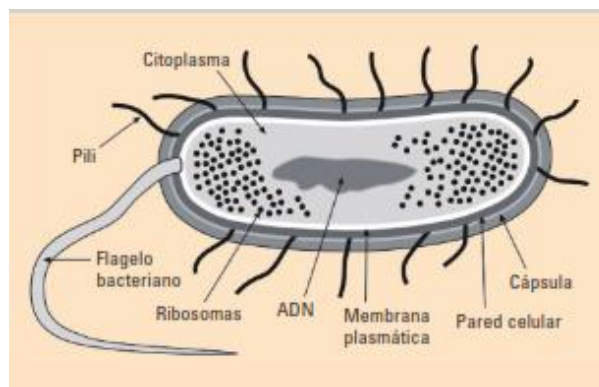


Figura 7: Esquemización estructural del género Enterobacteriaceae.

Tomado de: (Puerta & Mateos, 2010) *Enterobacterias*

Por otra parte, los ***pili*** sexuales están relacionados con el intercambio de material genético mediado por plásmidos (Fig. 9), hoy en día es un tema importante de estudio

debido a su relación con la adquisición de genes de resistencia a numerosos antibióticos entre ellos los de amplio espectro como los betalactámicos (De la Rosa *et al.*, 2011; Satán & Tamayo, 2016).

Pili sexual e intercambio de material genético

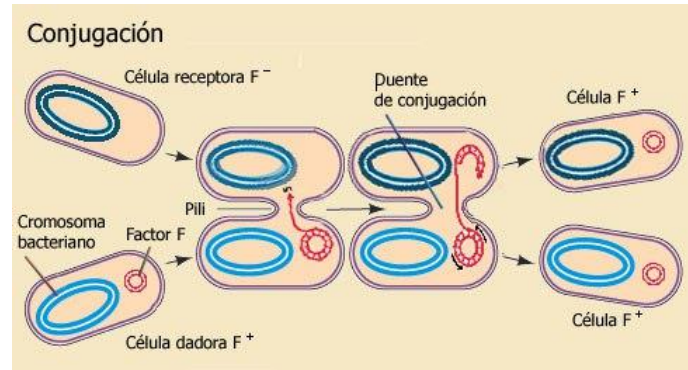


Figura 8: Esquematzación del intercambio de material genético mediado por plásmidos en enterobacterias.

Tomado de: (Ramirez, 2016) *Mecanismos de intercambio de material genético en bacterias*

Capítulo 2

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Coordinación Zonal 9-INSPI CZ9, Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos CNR-RAM. Se utilizaron cepas bacterianas pertenecientes al cepario del CNR-RAM procedentes de diversas casas de salud del país.

2.1 Selección de Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas fueron seleccionadas de la base de datos del cepario del CRN-RAM del INSPI CZ-9 bajo los criterios específicos de búsqueda: Enterobacterias gram negativas y Resistencia Carbapenémicos. Todas las cepas bacterianas provenientes del cepario, fueron previamente analizadas mediante pruebas microbiológicas y de biología molecular confirmando la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos.

2.1.1 Reactivación de Cepas bacterianas.

Una vez seleccionadas las cepas bacterianas de interés se procedió a descongelar los viales a temperatura ambiente, posteriormente se realizó una homogenización en vortex por 1 minuto y por 3 veces. Con la finalidad de recuperar y masificar la concentración de bacterias se realizó la siembra en el medio de cultivo nutritivo caldo cerebro-corazón (BHI por sus siglas en inglés) que favorece el crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes, se inoculó 10 µL de la suspensión descongelada y se dejó en incubación a 37 °C por 24h.

Luego se realizó siembra por estriado en Agar MacConkey que es un medio selectivo y diferencial para recuperación de enterobacterias y bacilos gram negativos entéricos, se dejó en incubación a 37 °C por 24h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se verificó el crecimiento de las cepas reactivadas y se procedió a realizar suspensiones de respaldo de las cepas, usando un asa estéril se recolectó varias colonias y se inocularon en 5 mL de BHI + glicerol 20%, se homogenizaron en vortex por 1 minuto y se guardaron a -20 °C hasta su próximo uso. También se realizaron suspensiones bacterianas para los ensayos de biología molecular, usando un asa estéril se recolectó varias colonias y se inocularon en 500 µL de Buffer TE 1X (10 Mm Tris HCl, 1 Mm EDTA pH= 8.0), se homogenizaron en vortex por 1 minuto y se transportaron al laboratorio de biología molecular.

2.2 Estandarización del protocolo de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).

Para comenzar con el proceso de estandarización se recopiló toda la información necesaria sobre la técnica, los oligonucleótidos necesarios y las secuencias del gen de interés.

Siguiendo las sugerencias descritas por Notomi *et al.* (2000), Mori *et al.* (2001), Tomita *et al.* (2008), Solanki *et al.* (2013), Cheng *et al.* (2014), Nakano *et al.* (2014), Srisrattakarn *et al.* (2017) y Wong *et al.* (2017), se realizaron ensayos evaluando variables como la Temperatura de incubación, concentración de reactivos (oligonucleótidos, dNTPs, Mg²⁺, betaína) y calidad de la muestra de ADN. Los reactivos utilizados se describen en el Anexo 4.

La detección de los productos amplificados por LAMP se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa grado analítico al 1% (Promega, lot: 0000129819), en Buffer TBE 1X, corriéndose a 90 V por 30 minutos. Para visualizar las bandas de ADN se tiñó el gel sumergiéndolo en solución de Bromuro de Etidio (BrEt) por 20 minutos, este método se usó para todos los ensayos del presente trabajo.

2.2.1 Análisis de oligonucleótidos LAMP mediante alineamiento a secuencias del gen *bla-KPC* de interés.

Como primer paso se realizó la búsqueda de todas las secuencias de las diferentes variantes del gen *bla-KPC* reportadas en el portal **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes** (<https://www.lahey.org/Studies>) (Bush, Palzkill, & Jacoby, 2017).

Usando el número de acceso de cada variante se realizó la búsqueda y descarga de las secuencias que reposan en la base de datos de nucleótidos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Las secuencias fueron alineadas usando el programa Mega 7 con la finalidad de encontrar regiones homologas entre todas variantes del gen *bla-KPC*.

Los grupos de oligonucleótidos LAMP fueron seleccionados mediante revisión bibliográfica, encontrando 4 artículos científicos de diferentes revistas, autores y años, los cuales empleaban LAMP como técnica de detección del gen *bla-KPC* (Anexo 5). Con los 4 grupos de oligonucleótidos se realizó un nuevo alineamiento con todas las secuencias de las variantes del gen *bla-KPC* (1-24), verificando su capacidad de reconocer todas las variantes en la región homóloga encontrada, además de evaluar sus características de diseño y ubicación.

Para la selección de los oligonucleótidos se tomaron en cuenta los criterios de diseño de oligonucleótidos LAMP de Eiken Chemical Co. (2006).

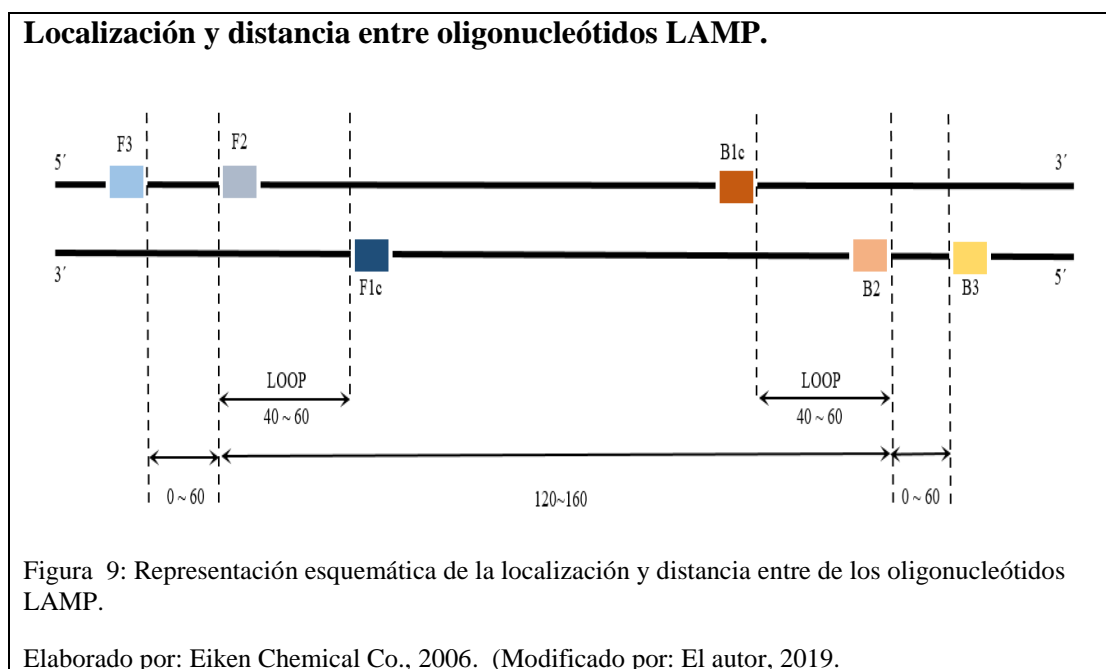
La temperatura de melting “ T_m ” fue calculada bajo condiciones experimentales fijas, concentración de oligonucleótidos a 0.1 μ M, concentración de iones de sodio a 50 mM y concentración de iones de magnesio a 4 mM. Además, se analizó de forma individual la T_m para las secuencias F1c y B1c que deben tener temperaturas entre 64 - 66 °C, para las secuencias F2, B2, F3 y B3 deben tener temperaturas entre 59 - 61 °C, y para los oligonucleótidos bucle la T_m debe ser similar a 60 °C (Notomi *et al.*, 2000).

La estabilidad del extremo terminal es un factor importante, sirve como punto de partida de la síntesis de ADN y, por lo tanto, debe tener cierto grado de estabilidad (Eiken Chemical Co., 2006). Los extremos 3' de F2 / B2, F3 / B3 y FLP / BLP y el extremo 5' de F1c / B1c se analizaron mediante la energía libre de Gibbs cuyo valor debe estar próximo a -4 kcal / mol. El extremo 5' de F1c después del proceso de amplificación corresponde al extremo 3' de F1, por lo que la estabilidad es un factor importante que evita la formación de estructuras secundarias por complementariedad (Notomi *et al.*, 2000; Eiken Chemical Co., 2006).

El contenido de GC de los oligonucleótidos LAMP fue calculado teniendo en cuenta las condiciones experimentales fijas mediante el programa “Melting Temperature (T_m) Calculation” (<http://insilico.ehu.es/tm.php?primer=&cp=200&cs=50&cmg=0>). Los oligonucleótidos LAMP deben estar diseñados de tal manera que el contenido de GC esté entre 40 – 65%, sin embargo, un contenido de 50 – 60% se pueden dar buenos oligonucleótidos (Eiken Chemical Co., 2006; Sánchez *et al.*, 2014).

Mediante el alineamiento de los oligonucleótidos LAMP a la región homologa del gen *bla-KPC* se determinó la localización y distancia entre los extremos terminales 5' de F2

y B2 que debe estar entre 120 -160 pb, F2 y F1c debe estar entre 40 – 60 pb lugar donde se unen los oligonucleótidos bucle (Loop) y la distancia entre el extremo terminal 3´de F3 o B3 al extremo terminal 5´ de F2 o B2 debe estar entre 0-60 pb (Fig. 10) (Eiken Chemical Co., 2006; Sánchez *et al.*, 2014).



2.2.2 Pre-mezcla de reacción.

La pre-mezcla de reactivos se hizo siguiendo la metodología descrita por Chuva (2017), los reactivos fueron descongelados siguiendo los protocolos de seguridad, a continuación se homogenizaron en vortex por 5-10 segundos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 20 segundos.

Se preparó siguiendo el orden y las concentraciones presentadas en la tabla 1. Una vez preparada la pre-mezcla se homogenizó en vortex por 5-10 segundos, y se procedió a dispensar 23 µL en cada tubo PCR (200 µL) previamente etiquetado.

Para el ensayo de gradiente de temperatura se añadió 1 µL del control positivo o negativo según corresponda la etiqueta del tubo y se llevó al termociclador para la

etapa de desnaturalización y alineamiento. Una vez terminada esta etapa se añadió 1 μL de la enzima *Bst* ADN polimerasa a cada tubo y fueron llevados nuevamente al termociclador para continuar con la etapa de extensión.

Tabla 1: Pre-mezcla de reacción LAMP para ensayos de gradientes de temperatura.

<i>Reactivo</i>		<i>Concentración</i>		<i>Volumen</i>	
		Inicial	Final	por reacción:	
Agua PCR		---	---	12,9	μL
Buffer BST		10X	1X	2,5	μL
Betaina		4 M	0,8 M	5	μL
Solución dNTPs		10 mM	0,8 mM	2	μL
Oligonucleótido	FIP	100 μM	1,6 μM	0,4	μL
Oligonucleótido	BIP	100 μM	1,6 μM	0,4	μL
Oligonucleótido	F3	25 μM	0,2 μM	0,2	μL
Oligonucleótido	B3	25 μM	0,2 μM	0,2	μL
Oligonucleótido	FLP	100 μM	0,8 μM	0,2	μL
Oligonucleótido	BLP	100 μM	0,8 μM	0,2	μL
Muestra de ADN		*** $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	*** $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1	μL
<i>Desnaturalización y Alineamiento.</i>					
Enzima <i>Bst</i> ADN polimerasa		8U	0.32 U	1	μL
<i>Extensión y Finalización.</i>					
Volumen Final:		*****	*****	25	μL

Nota : Chuva, 2017. (Modificado por: El autor)

Para los demás ensayos de optimización la pre-mezcla se preparó siguiendo el orden y las concentraciones presentadas en la tabla 2. La concentración de los diferentes reactivos fue variando según el ensayo de optimización. Una vez preparada la pre-mezcla se homogenizó en vortex por 5-10 segundos, y se procedió a dispensar 24 μL en cada tubo PCR (200 μL) previamente etiquetado.

De manera individual se añadió 1 μL del control positivo o negativo según corresponda la etiqueta del tubo y se llevó a condiciones isotérmicas en un termobloque.

Tabla 2: Pre-mezcla de reacción LAMP bajo condiciones isotérmicas.

Reactivo		Concentración		Volumen	
		Inicial	Final	Variable por reactivo:	
Agua PCR		---	---	--	μL
Buffer BST		10X	1X	2,5	μL
Betaina		4 M	0,8 M	5	μL
MgSO ₄ o MgCl ₂		100mM	6mM	1.5	μL
Solución dNTPs		10 mM	0,8 mM	2	μL
Oligonucleótido	FIP	100 μM	1,6 μM	0,4	μL
Oligonucleótido	BIP	100 μM	1,6 μM	0,4	μL
Oligonucleótido	F3	25 μM	0,2 μM	0,2	μL
Oligonucleótido	B3	25 μM	0,2 μM	0,2	μL
Oligonucleótido	FLP	100 μM	0,8 μM	0,2	μL
Oligonucleótido	BLP	100 μM	0,8 μM	0,2	μL
Enzima <i>Bst</i> ADN polimerasa		8U	0.32U	1	μL
Muestra de ADN		***μg/μl	***μg/μl	1	μL
Volumen Final:		*****	*****	25	μL

Nota : Chuva, 2017. (Modificado por: El autor)

2.2.3 Gradiente de Temperatura.

Con la finalidad de identificar la temperatura óptima de amplificación se siguieron las recomendaciones de Srisrattakarn *et al.* (2017). Se realizó un gradiente que utiliza temperaturas entre 55 – 65 °C formando 8 grupos, cada grupo tenía un control positivo para el gen *bla-KPC* y un control negativo (Buffer TE 1X) proporcionados por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM. (Tabla 3).

Tabla 3: Grupos de gradientes de temperatura

	Temperatura		Temperatura
Grupo A	65 °C	Grupo E	59 °C
Grupo B	64.3 °C	Grupo F	57.3 °C
Grupo C	63.1 °C	Grupo G	56 °C
Grupo D	61.3 °C	Grupo H	55 °C

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

El gradiente de temperatura se realizó en un Termociclador, Amplificador de ADN Bio-Rad modelo C1000, en el cual se programó el protocolo de amplificación LAMP empezando con la etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de la etapa de alineamiento a 5 °C por 5 minutos, luego se realizó una pausa para agregar 1µl de la enzima *Bst* ADN polimerasa en cada tubo PCR, se reanudó el protocolo con la etapa de extensión en donde se programó el gradiente y se colocó los tubos a diferentes temperaturas partiendo de 55 °C hasta 65 °C y se dejó incubar por 60 minutos, para finalizar la amplificación se inactivó la enzima subiendo la temperatura a 80 °C por 10 minutos y se dejó en reposo a 4 °C al infinito.

2.2.4 Gradiente de concentración de oligonucleótidos.

Los resultados del ensayo de gradiente de temperaturas revelaron la formación de estructuras secundarias. Las estructuras secundarias pueden formarse por la disponibilidad de oligonucleótidos en la reacción, por lo que para evitar su presencia se procedió a realizar un gradiente de concentración de oligonucleótidos FIP/BIP con la finalidad de reducir la formación de este tipo de estructuras y garantizar la máxima amplificación de ADN, también se evaluó la amplificación cuando faltan los oligonucleótidos de enganche FLP/BLP.

Para evaluar diferentes concentraciones de los oligonucleótidos se establecieron 8 grupos (Tabla 4), cada grupo formado por un control positivo para el gen *bla-KPC* y un control negativo (Buffer TE 1X) proporcionados por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM.

Tabla 4 :Grupos de gradientes de concentración de oligonucleótidos.

Oligonucleótidos				Oligonucleótidos			
	FIP/BIP	F3/B3	FLP/BLP		FIP/BIP	F3/B3	FLP/BLP
Grupo A	0.4 μM	0.2 μM	0.8 μM	Grupo E	0.4 μM	0.2 μM	----
Grupo B	0.8 μM	0.2 μM	0.8 μM	Grupo F	0.8 μM	0.2 μM	----
Grupo C	1.2 μM	0.2 μM	0.8 μM	Grupo G	1.2 μM	0.2 μM	----
Grupo D	1.6 μM	0.2 μM	0.8 μM	Grupo H	1.6 μM	0.2 μM	----

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

Cada tubo PCR (200 μ L) previamente etiquetado contenía 23 μ L de la pre-mezcla de reacción de amplificación, 1 μ L del control positivo o negativo y 1 μ L de la enzima *Bst* ADN polimerasa, con un volumen final de 25 μ L.

En base a los resultados del gradiente de temperaturas, para los siguientes ensayos la reacción de amplificación será incubada a 63 °C por 60 minutos usando un termobloque, Thermomixer confort, Eppendorf®, seguido de un aumento en la temperatura a 80 °C por 10 minutos para inactivar y finalizar el proceso de amplificación.

2.2.5 Gradiente de concentración del donador de Mg^{+2} .

El ion magnesio Mg^{2+} funciona como cofactor en la actividad de la ADN polimerasa permitiendo incorporar desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) durante la polimerización, los iones de magnesio al unirse al sitio activo de la enzima catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre el 3'-OH de un cebador y el grupo fosfato de uno de los dNTPs formando estructuras llamadas pirofosfatos de magnesio

(ThermoFisher, 2018), en la técnica LAMP la temperatura isotérmica (55 – 65 °C) favorece la presencia de estos en el medio de reacción, volviendo turbio el medio y permitiendo evaluar el resultado de manera visual. (Notomi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2014).

Para conocer la concentración mínima requerida del donador de ion Mg^{+2} que permita detectar por turbidez una amplificación positiva, se establecieron 4 grupos con diferentes concentraciones tanto para $MgSO_4$ y $MgCl_2$ (Tabla 5), cada grupo formado por un control positivo al gen *bla-KPC* y un control negativo (Buffer TE 1X) proporcionados por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM.

Tabla 5: Grupos de gradientes de concentración de donadores de Mg^{+2}

Donador de Mg^{+2}		Donador de Mg^{+2}	
	$MgSO_4$		$MgCl_2$
Grupo A	4 mM	Grupo E	4 mM
Grupo B	6 mM	Grupo F	6 mM
Grupo C	8 mM	Grupo G	8 mM
Grupo D	10 mM	Grupo H	10 mM

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

2.2.6 Gradiente de concentración de dNTPs.

Entre las recomendaciones de Srisrattakarn *et al.* (2017), mencionan que los desoxinucleótidos (dNTPs) deben estar presentes en cantidad suficiente para poder lograr el proceso de extensión bajo condiciones isotérmicas. Para estandarizar la concentración de dNTPs para amplificar ADN mediante LAMP se establecieron 6 grupos con concentraciones entre 0.4 – 1.4 mM (Tabla 6), cada grupo formado por un control positivo para el gen *bla-KPC* y un control negativo (Buffer TE 1X).

Tabla 6: Grupos de gradientes de concentración de desoxinucleótidos (dNTPs).

dNTPs		dNTPs	
Grupo A	0.4 mM	Grupo D	1 mM
Grupo B	0.6 mM	Grupo E	1.2 mM
Grupo C	0.8 mM	Grupo F	1.4 mM

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

2.2.7 Gradiente de concentración de betaína.

El uso de betaína favorece la accesibilidad de la enzima ADN polimerasa a las regiones diana del ADN, desestabilizando las secuencias de ADN ricas en GC, permitiendo aumentar la velocidad general de la reacción, la selectividad de los oligonucleótidos a la región de interés y evitando la amplificación de secuencias inespecíficas.

Para determinar la concentración mínima de betaína en la amplificación LAMP, se establecieron 6 grupos con concentraciones entre 0.0 – 1 M (Tabla 7), cada grupo formado por un control positivo para el gen *bla-KPC* y un control negativo (Buffer TE 1X) proporcionados por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM.

Tabla 7: Grupos de gradientes de concentración de betaína.

Betaína		Betaína	
Grupo A	---	Grupo D	0.6 M
Grupo B	0.2 M	Grupo E	0.8 M
Grupo C	0.4 M	Grupo F	1 M

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

2.2.8 Calidad de la Muestra.

La purificación previa de ADN es un requisito muy importante en diversas técnicas que realizan amplificación de ácidos nucleicos, sin embargo, en el caso de LAMP no

necesita de ADN purificado para tener una amplificación eficiente ya que es capaz de tolerar componentes de medios de cultivo y sustancias biológicas que pueden inhibir la reacción en otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Se realizaron varios ensayos LAMP usando como muestra: suspensiones bacterianas, ADN extraído por KIT y ADN extraído por lisis térmica a partir del cultivo de la cepa ATCC 1705 *Klebsiella pneumoniae bla-KPC*. Para cada tipo de muestra se establecieron tres grupos cada uno con un volumen de 1 a 3 µL (Tabla 8), cada grupo formado por un control positivo al gen *bla-KPC* y un control negativo (Buffer TE 1X) proporcionados por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM.

Tabla 8: Grupos de Volumen de ADN.

	ADN extraído por KIT comercial	ADN extraído por lisis térmica	Suspensión bacteriana 0.5 McFarland
Grupo A1	1 µL	1 µL	1 µL
Grupo A2	2 µL	2 µL	2 µL
Grupo A3	3 µL	3 µL	3 µL

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

2.2.8.1 Ensayo LAMP con ADN extraído por Kit.

Siguiendo la metodología descrita por la misma casa comercial Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA, utilizando los reactivos provistos por el Kit, se procedió a realizar la extracción de ADN a partir de una suspensión bacteriana de la cepa ATCC 1705 *Klebsiella pneumoniae bla-KPC* positivo en Buffer Te 1X, reactivada en agar MacConkey 24h antes del ensayo.

2.2.8.2 Ensayo LAMP con ADN extraído por lisado térmico.

Se realizó la extracción de ADN a partir de una suspensión bacteriana de la cepa ATCC 1705 *Klebsiella pneumoniae bla-KPC* positivo en Buffer Te 1X, reactivada en agar MacConkey 24h antes del ensayo. La suspensión se homogenizó en vortex por 1 minuto, se dejó en incubación a 95 °C por 10 minutos en Termobloque y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. Para finalizar se procedió a retirar el sobrenadante colocándolo en un microtubo estéril de 0.5 mL con su respectiva rotulación y almacenándolo a -20 °C hasta su uso.

2.2.8.3 Ensayo LAMP con suspensión bacteriana 0.5 McFarland.

Los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, para lo cual se realizó una suspensión 0.5 a partir del cultivo de la cepa ATCC 1705 *Klebsiella pneumoniae bla-KPC* positivo. Como primer paso se calibró el turbidímetro Thermo Oxoid Turbidometer-AU0107A usando la solución estándar No. 0.5 que corresponde aproximadamente a 1.5×10^8 UFC por mL (Silva, 2016).

Segundo, con un asa estéril se inoculó y homogenizó colonia a colonia en un tubo de ensayo con 10 mL de Buffer TE 1X (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH= 8.0), hasta que el turbidímetro de positivo a la concentración calibrada, una vez realizada la suspensión fue transportada al laboratorio de biología molecular.

Para todos los ensayos de calidad de muestra en cada tubo PCR se añadió 24 µL de la pre-mezcla (Tabla 5) y de manera individual se añadieron de 1 a 3 µL de control positivo o negativo según sea el grupo de muestra a evaluar, dando un volumen final de 25 µL. Luego todos los tubos fueron llevados a condiciones isotérmicas de

incubación 63 °C por 60 minutos usando un Termobloque, Thermomixer confort, Eppendorf®, una vez transcurrido este tiempo se elevó la temperatura hasta 80 °C por 10 minutos para inactivar la enzima y terminar el proceso de amplificación.

2.3 Evaluación de la capacidad diagnóstica de LAMP.

2.3.1 Determinación de la especificidad de LAMP.

Para evaluar la especificidad de la técnica LAMP hacia la región diana de ADN se realizó una comparación con la técnica PCR de punto final. Se utilizaron 20 cepas de bacterias Gram negativas reportadas con la presencia del gen *bla-KPC* y 20 cepas con presencia de diferentes genes de resistencia a carbapenémicos como: *BLEE*, *bla-IMP*, *bla-NDM*, *bla-OXA-48* y *bla-Ctx-m*, todos confirmados por análisis de microbiología y biología molecular del CRN-RAM. La evaluación se hizo por triplicado, todo el lote de cepas bacterianas fueron reactivadas previamente como se indica en la sección 2.1.1, una vez reactivadas se realizaron suspensiones bacterianas en Buffer TE 1X y se trasladaron al laboratorio de biología molecular en donde se extrajo el ADN usando el método de lisado térmico: 95 °C por 10 minutos seguido de una centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos, se extrajo el sobrenadante, se colocó en un microtubo de 0.5 mL y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se realizó un ensayo control mediante PCR de punto final, con la finalidad de verificar la presencia o ausencia del gen descrito, se usaron oligonucleótidos del sistema de vigilancia, los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM, mismos que fueron reportados por Satán & Tamayo (2016): KPC-F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG, KCP-R: CTTGTCATCCTTGTTAGGCG.

Se seleccionaron 6 cepas al azar de ambos grupos.

La pre-mezcla de reacción PCR (Tabla 9) se realizó siguiendo la metodología descrita por Satán & Tamayo (2016), y fueron agregados en el siguiente orden:

Tabla 9: Pre-mezcla de reacción PCR para ensayos de especificidad.

Reactivo	Concentración		Volumen	
	Inicial	Final	por reacción*n	
Agua PCR	---	---	10	μL
Oligonucleótido KPC-F	10 μM	0.4 μM	1	μL
Oligonucleótido KPC-R	10 μM	0.4 μM	1	μL
GoTaq MASTER Mix	2X	0.96	12	μL
Muestra de ADN	***μg/μl	***μg/μl	1	μL
Volumen Final:	*****	*****	25	μL

Nota: n= número de muestras a evaluar. (Elaborado por: El autor).

En cada tubo PCR se añadió 24 μL de la pre-mezcla de reacción y 1 μL de la muestra de ADN, como control positivo se utilizó un pool de genes de resistencia (*bla-KPC* (798pb), *bla-OXA-48* (438pb) y *bla-IMP* (232pb)) utilizado en el sistema de vigilancia del CRN-RAM. Luego los tubos fueron llevados al Termociclador, Amplificador de ADN Bio-Rad modelo C1000, en el cual se programó el protocolo de termociclador bajo las siguientes condiciones (Tabla 10):

Tabla 10: Protocolo de termociclado PCR para ensayos de especificidad.

ETAPA		TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial		94 °C	10 minutos
35 CICLOS	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
	Hibridación	52.8 °C	40 segundos
	Extensión	72 °C	50 segundos
Extensión final		72 °C	5 minutos
Conservación		4 °C	∞

Nota: Elaborado por: El auto, 2018.

La pre-mezcla de reacción para el ensayo LAMP (Tabla 2) se realizó siguiendo la metodología descrita por Chuva (2017), en cada tubo PCR se añadió 24 µL de la pre-mezcla y 1 µL de muestra de ADN, con un volumen final de 25 µL.

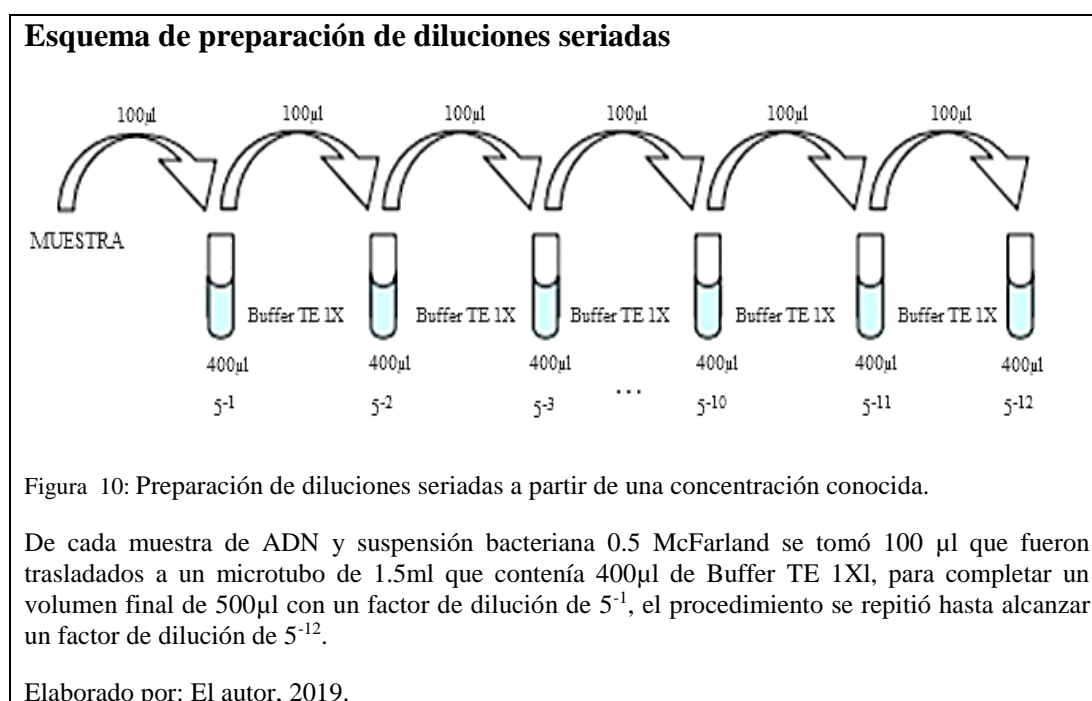
Luego todos los tubos fueron llevados a condiciones isotérmicas de incubación 63 °C por 60 minutos usando un Termobloque, Thermomixer confort, Eppendorf®, una vez transcurrido este tiempo se elevó la temperatura hasta 80 °C por 10 minutos para inactivar la enzima y terminar el proceso de amplificación.

2.3.2 Determinación de la sensibilidad de LAMP.

Para detectar la sensibilidad de LAMP y PCR de punto final, primero se realizó la cuantificación de ADN extraído por Kit y ADN extraído por lisado térmico con la finalidad de evaluar la calidad del ADN obtenido y realizar diluciones seriadas a partir de una concentración conocida. Se realizó una dilución 1:10 (10 µL en 100 µL) de las muestras de ADN extraídas por los dos métodos, se homogenizó y se colocó en una cubeta. Para calibrar en cero el espectrofotómetro se usó 1 mL de Buffer TE 1X para ADN extraído por lisado térmico y 1mL de Buffer de elución provisto por el Kit para ADN extraído por este método.

La determinación de la calidad y la cantidad del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer® plus, 2007), para determinar la concentración de ADN y proteínas se utilizó el cociente de absorción A260/280, mismo que permitió estimar la pureza del ADN, valores entre 1.6 a 2 indican que la muestra contiene casi exclusivamente ADN, valores inferiores indicarían contaminación de proteínas o fenoles, para lo cual se utilizó el cociente de absorción A260/A230 que permite conocer la cantidad de contaminantes (hidratos de carbono,

péptidos, fenoles, compuestos aromáticos, etc.) que hay en la muestra, se considera pura a una muestra cuando el valor resultante está en el rango de 2.0 a 2.2, valores inferiores indicarían contaminación (López & Mejía, 2012; Sandoval Rodriguez, Martinez Rizo, & López de de la Mora, 2013; Alejos Velázquez, Aragón Martínez, & Cornejo Romero, 2014). Las diluciones seriadas se realizaron a partir de una concentración conocida de cada muestra de ADN (5^0), utilizando un factor de dilución de 1/5 (Fig. 11) hasta alcanzar la dilución de 5^{-12} , sin embargo, por cuestión de recursos solo se utilizó las concentraciones pares (5^0 , 5^{-2} , 5^{-4} , 5^{-6} , 5^{-8} , 5^{-10} , 5^{-12}), cada dilución se realizó por triplicado con la finalidad de determinar cuál es el límite de detección de las técnicas LAMP y PCR de punto final.



La pre-mezcla de reacción PCR se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el ensayo de especificidad (Tabla 9) variando la muestra de ADN.

En cada tubo PCR se añadió 24 µL de la pre-mezcla de reacción y 1 µL de cada dilución seriada de la muestra de ADN. Luego los tubos fueron llevados al Termociclador,

Amplificador de ADN Bio-Rad modelo C1000, en el cual se programó el protocolo de termociclador bajo las siguientes condiciones (Tabla 10).

La pre-mezcla de reacción para el ensayo LAMP (Tabla 2) se realizó siguiendo la metodología descrita por Chuva (2017), variando la muestra de ADN. En cada tubo PCR se añadió 24 µL de la pre-mezcla y 1 µL de muestra de ADN, con un volumen final de 25 µL. Luego todos los tubos fueron llevados a condiciones isotérmicas usando un Termociclador, Amplificador de ADN Bio-Rad modelo C1000, por tener mayor capacidad que el Termobloque, el protocolo usado fue programado bajo las siguientes condiciones (Tabla 11):

Tabla 11: Condiciones de amplificación LAMP.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
EXTENSIÓN	63 °C	60 minutos
INACTIVACIÓN	80 °C	10 minutos
CONSERVACIÓN	4 °C	∞

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

2.4 Análisis e Interpretación de resultados.

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP como método de detección del gen *bla-KPC* en bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos, se corroboraron los resultados de la amplificación de ácidos nucleicos contra la técnica PCR de punto final.

Los datos obtenidos en los ensayos se analizaron en una tabla de cuatro casillas como se especifica en la tabla 12.

Tabla 12: Tabla de cuatro casillas.

Resultado de la Prueba		PCR punto Final	
		Positivo	Negativo
<i>LAMP</i>	Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
	Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Nota: Ramos, 2018. (Modificado por: El autor).

La especificidad se refiere a la probabilidad de que en una prueba diagnóstica un sujeto sano tenga un resultado negativo, se calculó usando la siguiente fórmula:

$$(1)\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos (VN)}}{\text{Falsos positivos (FP)} + \text{Verdaderos negativos(VN)}} * 100\%$$

Tomado de: Ramos, 2018.

La Sensibilidad se define como la probabilidad de que en una prueba diagnóstica un sujeto enfermo de un resultado positivo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$(2)\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos (VP)}}{\text{Verdaderos Positivos (VP)} + \text{Falsos Positivos(FP)}} * 100\%$$

Tomado de: Ramos, 2018.

La reproductividad se define como la capacidad del test para repetir los mismos resultados en circunstancias similares, se probó mediante la valoración por triplicado de cada ensayo.

Se analizó mediante referencias bibliográficas la capacidad diagnóstica de la técnica LAMP para detectar la presencia del gen *bla-KPC* en bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Cepas Bacterianas.

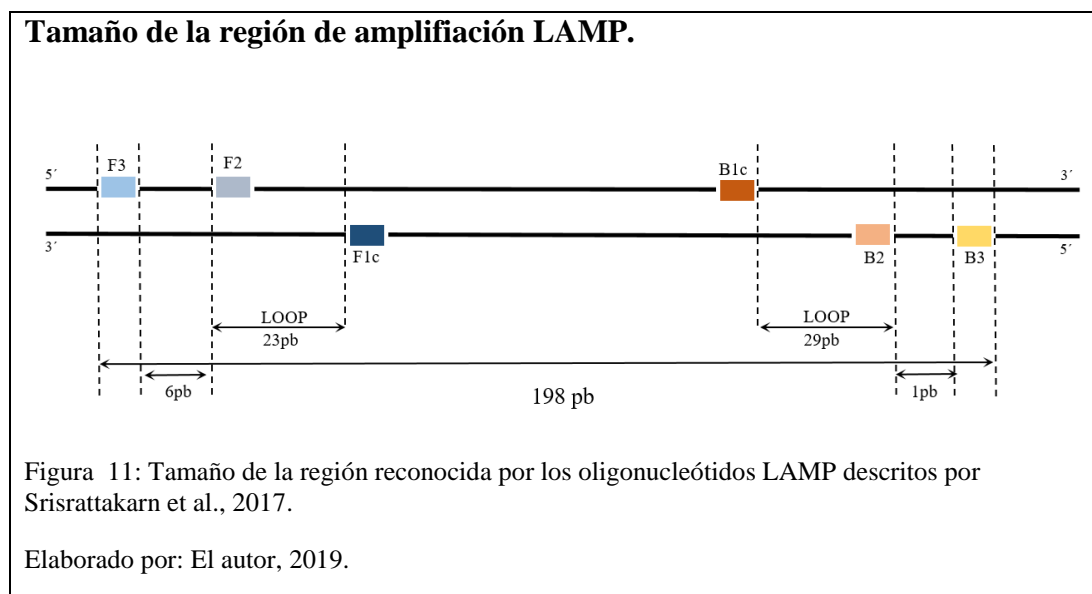
La búsqueda de cepas bacterianas se realizó en la base de datos del CRN-RAM bajo los siguientes criterios de selección: bacterias Gram negativas y resistentes a carbapenémicos. Con el propósito de realizar análisis de especificidad de la técnica LAMP se seleccionaron dos grupos de cepas bacterianas (Anexo 6), el primero con cepas portadoras del gen *bla-KPC* de las cuales se escogieron, 3 cepas del año 2013, 4 cepas del año 2014, 1 cepa del año 2016 pertenecientes a investigaciones previas, 1 cepa ATCC 1705 como control positivo para el gen *bla-KPC* y 10 cepas correspondientes al periodo enero – julio 2017, teniendo un tamaño de muestra final $n = 20$. El segundo grupo con cepas portadoras de diferentes genes de resistencia a carbapenémicos como: *bla-IMP*, *bla-NDM*, *bla-OXA-48* y *bla-Ctx-m* con un tamaño de muestra $n = 20$ del periodo enero – julio 2017.

3.2 Identificación de la secuencia homóloga.

El alineamiento entre las diferentes secuencias del gen *bla-KPC* (Anexo 7) dio como resultado un región homóloga de 738 pb, región que coincide con lo obtenido por Solanki *et al.* (2013), Nakano *et al.* (2014), Cheng *et al.*, (2014) y Srisrattakarn *et al.* (2017), quienes utilizaron esta zona para el diseño de oligonucleótidos LAMP.

El alineamiento de los grupos de oligonucleótidos LAMP a la región homóloga dio como resultado que todos se unían dentro de la zona anteriormente mencionada, sin embargo el grupo de oligonucleótidos descritos por Srisrattakarn *et al.* (2017) (Tabla 13), demostraron ser idóneos para el protocolo de estandarización LAMP.

Los oligonucleótidos seleccionados se alinearon a todas las secuencias de las diferentes variantes del gen *bla-KPC*, uniéndose en la región homóloga (Fig. 12), reconociendo una región 198pb (Anexo 8), lo cual coincide con el rango descrito por Notomi *et al.* (2000) y Tomita *et al.* (2008), quienes mencionan que los mejores resultados de amplificación podrían darse a partir de 130 a 200 pb del ADN diana.



Aun cuando las *T_m* de los oligonucleótidos fueron mayores a 65 °C, su estabilidad en los extremos terminales presentaron valores similares a -4 Kcal/mol (Tabla 13) lo que indica una buena estabilidad como sugieren Notomi *et al.* (2000), Eiken Chemical Co. (2006) y Tomita *et al.* (2008). Además, cumplen con las características de diseño descritas por Notomi *et al.* (2000), Eiken Chemical Co. (2006) y Tomita *et al.* (2008), quienes indican que la técnica LAMP requiere de 4 a 6 oligonucleótidos: 2 externos F3 y B3, 2 internos FIP (F1c, F2) y BIP (B1c, B2) los cuales contienen dos secuencias distintas que corresponden a una secuencia sentido y otra anti-sentido del ADN diana, y 2 bucle FLP y BLP, diseñados para acelerar la reacción de amplificación uniéndose a sitios no accesibles por los oligonucleótidos internos (Notomi *et al.*, 2000; Eiken Chemical Co., 2006; Arroyo *et al.*, 2008; Tomita *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2014).

Los oligonucleótidos internos (FIP/BIP) (40 nucleótidos) representan la principal característica de la técnica LAMP, formados por dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido (F2 y B2) y anti-sentido (F1c y B1c) del ADN diana, cada una de 20-24 nucleótidos, unidas por un espaciador de timinas, de tal manera que durante el proceso de amplificación estas secuencias formen un bucle que facilita la unión de más oligonucleótidos favoreciendo una amplificación exponencial mediante un proceso cíclico que permite reducir el tiempo de reacción significativamente (Notomi *et al.*, 2000; Eiken Chemical Co., 2006; Arroyo *et al.*, 2008; Tomita *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2014).

Tabla 13: Grupo de oligonucleótidos LAMP.

Identificación rápida y sencilla de los genes carbapenemasa, bla-NDM, bla-OXA, bla-VIM, bla-IMP-14 y bla-KPC, en bacilos gramnegativos por amplificación isotérmica mediada por bucle interno con colorante azul hidroxinaftol. (Srisattakarn et al., 2017).

	Secuencias	Long.	Tm	%GC	ΔG
FIP	F1c 5'-GCGTACACACCGATGGAGCCGCC-3'	23	78.6	69.6	-5.09
	F2 5'-CCAACCTCGTCGCGGAACCAT-3'	21	73.9	61.9	
BIP	B1c 5'-GGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTAC-3'	24	72.6	54.2	-4.80
	B2 5'-GCAGCAAGAAAGCCCTTG AATGAG-3'	24	71.4	50	
F3	5'-GGCTGGCTTTTCTGCCACCG-3'	19	73.4	68.4	-2.41
B3	5'-GGCTGCGAGCCAGCACAGC-3'	19	73.7	73.7	-3.05
FLP	5'-AGTCCTGTTCGAGTTAGCGA-3'	21	67.8	47.6	-0.17
BLP	5-CTGAGGAGCGCTTCCACTG-3'	20	71.5	65	-1.23

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

3.2.4 Optimización de las condiciones de amplificación LAMP.

3.2.4.1 Gradiente de Temperatura.

Para el presente estudio la técnica LAMP fue capaz de amplificar ADN bajo condiciones isotérmicas de incubación de 56 - 65 °C (Anexo 9), resultados similares a

los reportados por varios autores, Notomi *et al.* (2000), mencionan que la temperatura de incubación debería estar entre 60 – 65 °C, ya que es la temperatura óptima para la *Bst* ADN polimerasa; Woniakowski, Kozdruń, & Samorek-Salamonowicz (2012), menciona que la temperatura isotérmica de amplificación estaba en el rango de 56 – 65 °C; Duan *et al.* (2014), coinciden con el rango de temperaturas descrito anteriormente. Nakano *et al.* (2014), identificaron que la temperatura óptima de incubación estaba entre 60 - 69 °C, Srisrattakarn *et al.* (2017), encontraron que LAMP trabaja bien con temperaturas de incubación que van desde 58.2 – 64.6 °C. En comparación con los diferentes reportes en este estudio se evidenció que la técnica LAMP puede incubarse a partir de 56 °C lo cual es un factor muy importante al momento de elegir un equipo de incubación que mantenga una temperatura estable como es el caso de un baño maría o un termobloque, haciendo que la técnica sea económicamente rentable para laboratorios e institutos de investigación poco familiarizados con PCR u otros métodos de análisis molecular (Notomi *et al.*, 2000, Cheng *et al.*, 2014, Duan *et al.*, 2014, Sánchez *et al.*, 2014, Ahmed *et al.*, 2016 y Pardo-Lledías *et al.*, 2017).

3.2.4.2 Gradiente de concentración de oligonucleótidos FIP/BIP.

Los resultados del gradiente de temperatura revelaron que LAMP fue capaz de amplificar ADN bajo condiciones isotérmicas desde 56 hasta 65°C, y que existía una alta concentración de estructuras secundarias en todas las temperaturas evaluadas, por lo cual se realizó un gradiente de concentración de oligonucleótidos FIP y BIP con la finalidad de reducir la formación dichas estructuras, además, se evaluó si el proceso de amplificación podía realizarse sin la presencia de los oligonucleótidos bucle FLP/BLP. Los oligonucleótidos internos (FIP/BIP) son muy importantes para

garantizar que la técnica funcione amplificando ADN en grandes cantidades, sin embargo, concentraciones mayores a 0.5 μM favorecen la formación de estructuras secundarias (Bolívar et al., 2014) (Anexo 10, parte inferior de carriles B, C, D). Reduciendo la eficiencia de amplificación y provocando lecturas incorrectas cuando se añaden tintes intercalantes como SYBR Green para analizar el resultado por fluorescencia (Tomita et al., 2008; Canene-Adams, 2013; Bolívar *et al.*, 2014).

Los resultados para esta investigación demuestran que la técnica LAMP fue capaz de amplificar ADN a partir de 0.4 μM de los oligonucleótidos FIP/BIP; 0.2 μM de los oligonucleótidos F3/B3 y 0.8 μM de los oligonucleótidos FLP/BLP, generando un bandeo claro, con buena intensidad y baja presencia de estructuras secundarias (Anexo 10, carril A). La concentración de oligonucleótidos FIP/BIP reportada en este estudio coincide con Zhang *et al.* (2016), quienes obtienen resultados positivos de amplificación, usando 0.4 μM de oligonucleótidos FIP/BIP.

Solanki *et al.* (2013), Cheng *et al.* (2014), Nakano *et al.* (2014) y Srisrattakarn *et al.* (2017), trabajaron con concentraciones de 1.6 μM para FIP/BIP; 0.2 μM para F3/B3 y 0.8 μM para FLP/BLP, obteniendo resultados satisfactorios de amplificación, sin embargo, en este estudio los resultados a esas concentraciones revelaron que el bandeo característico de LAMP no fue claro, y la presencia de estructuras secundarias se incrementó notablemente, por lo cual para los siguientes ensayos de optimización se eligió las concentraciones de 0.4 μM para FIP/BIP, 0.2 μM para F3/B3 y 0.8 μM para FLP/BLP, asegurando que el producto de la reacción en su mayoría fuese ADN amplificado. Cabe destacar que la concentración de 0.8 μM FIP/BIP también presentó resultados positivos (Anexo 10, carril B), que son similares a los reportados por Notomi *et al.* (2000), por lo cual no se descarta utilizar esta concentración como alternativa.

Otro resultado importante de esta investigación fue que la presencia de los tres grupos de oligonucleótidos tuvo fundamental importancia en la amplificación de ADN, la ausencia de los oligonucleótidos bucle inhibió la reacción por completo (Anexo 10, carriles E, F, G y H). Mwendwa *et al.* (2017), mencionan que al realizar un ensayo LAMP sin los oligonucleótidos bucle los resultados revelaron una baja y casi nula sensibilidad. Sánchez *et al.* (2014) y Srisrattakarn *et al.* (2017), indican que los oligonucleótidos bucle (FLP/BLP) se unen de manera adicional a sitios que no son accesibles por los oligonucleótidos internos (FIP/BIP), permitiendo acelerar y reducir considerablemente el tiempo de la reacción de amplificación, por lo cual el diseño del grupo de oligonucleótidos debe ser preciso (Tomita *et al.*, 2008).

3.2.4.3 Gradiente de concentración de donador de Mg^{2+} .

El $MgSO_4$ resultó ser el donador de Mg^{2+} indicado, añadir de 4 a 6 mM de $MgSO_4$, favoreció la amplificación de ADN generando bandas claras y buena intensidad (Anexo 11, carril A). La turbidez del medio de reacción fue mayor permitiendo analizar los resultados de manera visual, Mori *et al.* (2001), Suwancharoen, Sittwicchanwong, & Wiratsudakul (2016) y Srisrattakarn *et al.* (2017), usaron concentraciones finales de 8-10 mM de $MgSO_4$, logrando generar turbidez cuando la reacción de amplificación fue positiva, permitiendo discriminar resultados por inspección visual. Representando una clara ventaja sobre otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos, debido a la facilidad de interpretación, la rapidez y fidelidad con la que se obtiene el resultado (Notomi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2008).

Njiru (2012), Ranjbar & Afshar (2015) y Srisrattakarn *et al.* (2017), menciona que, para lograr un precipitado blanco, es necesario añadir un extra de Mg^{2+} . Notomi *et al.* (2000) y Mori *et al.* (2001), describen que la generación de turbidez en el medio de reacción se debe a la formación y acumulación de pirofosfatos de magnesio ($Mg_2P_2O_7$), identificados por análisis químicos y de espectrofotometría por Mori *et al.* (2001). Estos pirofosfatos permanecen en el medio de reacción debido a la temperatura de amplificación a la que trabaja LAMP (55-65 °C). En el caso de PCR de punto final los pirofosfatos son hidrolizados a 94 °C, por lo que al inicio de cada ciclo desaparecen y al final la reacción se ve translúcida (Sánchez *et al.*, 2014).

La concentración mínima de 2 mM de $MgSO_4$ proporcionada por la solución tampón o Buffer de amplificación es suficiente para que LAMP pueda amplificar ADN (Chuva, 2017), sin embargo, a esa concentración la generación de turbidez fue mínima por lo que no se pudo discriminar resultados por inspección visual. Añadir concentraciones superiores a 8 mM provocó la inhibición de la reacción de amplificación (Anexo 11, carriles C y D).

Concentraciones mayores a 4mM de Mg^{2+} producen productos inespecíficos de amplificación, debido a una reducción de la estabilidad de la ADN polimerasa y errores en la incorporación de dNTPs (ThermoFisher, 2018). El uso de $MgCl_2$ en este estudio no generó resultados claros de amplificación, no hubo presencia de bandas claras y se observó la inhibición de la reacción en su totalidad (Anexo 11, carriles E, F, G y H).

La función del Mg^{2+} es de cofactor, potenciando la actividad de la ADN polimerasa, es así que la mayoría de donadores de Mg^{2+} se comercialicen como una solución de $MgCl_2$, sin embargo, algunas ADN polimerasas prefieren $MgSO_4$ ya que el sulfato ayuda a garantizar un rendimiento más robusto del resultado.

Duan *et al.* (2014) y Zhang *et al.* (2016), utilizaron MgCl_2 como principal donador del ion Mg^{2+} obteniendo resultados positivos, pero cabe destacarse que ellos utilizaron una *Bst* ADN polimerasa (M0275S, BioLabs®inc.) la cual presenta mejor estabilidad en su actividad de polimerización. La estabilidad de la polimerasa es un factor clave a la hora de amplificar ADN usando cualquiera de los dos donares de Mg^{2+} (ThermoFisher, 2018).

3.2.4.4 Gradiente de concentración de dNTPs.

La concentración de 0.8 mM de la solución de dNTPs permitió obtener resultados positivos de amplificación, similar a lo reportado por Chuva (2017), en concentraciones menores la amplificación de ADN también fue positiva, sin embargo, las bandas fueron tenues, en concentraciones mayores la intensidad de las bandas aumentó al igual que la presencia de estructuras secundarias. Los dNTPs tienen la capacidad de captar iones de Mg^{2+} afectando la actividad de la polimerasa, reduciendo la especificidad y fidelidad de la amplificación o incluso llegando a inhibir la reacción, por lo cual ambas concentraciones deben estar siempre en equilibrio (ThermoFisher, 2018). Bolivar *et al.* (2014) y Srisrattakarn *et al.* (2017) mencionan que los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) deben estar presentes en cantidades de 0.2 – 1.4 mM para poder lograr el proceso de extensión bajo condiciones isotérmicas.

Ji *et al.* (2012), Solanki *et al.* (2013), Duan *et al.* (2014), Ranjbar & Afshar (2015), Suwancharoen *et al.* (2016), Chuva (2017), Gomes de Oliveira *et al.* (2017), Martzy *et al.* (2017) y Srisrattakarn *et al.* (2017), coinciden en que el uso de 1.4 mM de la solución de dNTPs fue la cantidad ideal garantizar la amplificación LAMP, sin embargo, en este estudio se demuestra que con 0.8mM de la solución de dNTPs se

puede obtener una buena amplificación de ADN generando bandeos claros y con mínima presencia de estructuras secundarias.

3.2.4.5 Gradiente de concentración de Betaína.

Los resultados obtenidos muestran que el uso de betaína fue importante para que la reacción LAMP se llevase a cabo. La ausencia o en concentraciones inferiores a 0.6 M de betaína fueron causantes de problemas de amplificación LAMP (Anexo 12, carriles A – C), en concentraciones mayores a 0.6 M la reacción de amplificación mejora considerablemente presentando el bandeo característico de LAMP (Anexo 12, carriles D - F), similar a lo reportados por Ji *et al.* (2012). Para desestabilizar la doble hélice de ADN y aumentar la eficiencia de amplificación por LAMP, es necesario añadir de 0.5 a 1.5 M de betaína (Notomi *et al.*, 2000; Martzy *et al.*, 2017). Ji *et al.* (2012), Cheng *et al.* (2014), Gomes de Oliveira *et al.* (2017) y Srisrattakarn *et al.* (2017), probaron varias concentraiones llegando a elegir 0.8 M de betaína como la concentración indicada. Cabe destacar que a mayor concentración de betaína se observaron mejores resultados de bandeo en geles de agarosa similar a lo que obtuvieron Duan *et al.* (2014), quienes usaron 0.94 M obteniendo buenos resultados tanto en geles de agarosa como con tintes indicadores de iones metálicos.

3.2.4.6 Calidad de la muestra.

Los resultados obtenidos muestran que la técnica LAMP es capaz de amplificar ADN usando de 1 a 2 µl de suspensión bacteriana, ADN extraído por Kit o ADN extraído por lisado térmico (Anexo 13). El uso de ADN purificado es un requisito muy importante para diversas técnicas que realizan amplificación de ácidos nucleicos, sin

embargo, en el caso de LAMP no necesita de ADN purificado para tener una amplificación eficiente (Motamedi *et al.*, 2011). La técnica LAMP es capaz de detectar el gen *bla-KPC* a partir de muestras de esputo, orina, fecales y de sangre, teniendo resultados similares cuando se usó ADN purificado (Nakano *et al.*, 2014).

LAMP presenta una tolerancia importante a componentes del medio de cultivo y sustancias biológicas que pueden inhibir la reacción en otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Arroyo *et al.*, 2008, Motamedi *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2014, Sánchez *et al.*, 2014; Fernández-Soto *et al.*, 2016). En el caso de PCR, contaminantes orgánicos e inorgánicos, introducidos durante el mismo proceso de reacción pueden inhibir la amplificación, precipitando o desnaturalizando el ADN, además pueden interaccionar con los iones Mg^{2+} , reduciendo su disponibilidad de unión con la ADN polimerasa (Sepúlveda, 2013). Con volúmenes de 3 μ L o más la reacción de amplificación fue inhibida (Anexo 13).

3.3 Evaluación de la capacidad diagnostica de LAMP.

3.3.1 Determinación de la especificidad LAMP.

Los oligonucleótidos LAMP amplificaron únicamente para las cepas reportadas con el gen *bla-KPC* (Anexo 14a). Estos resultados coinciden con lo reportado por Solanki *et al.* (2013), Cheng *et al.* (2014), Nakano *et al.* (2014) y Srisrattakarn *et al.* (2017), quienes realizaron ensayos de amplificación LAMP para detectar diferentes genes de resistencia a carbapenémicos con un determinado grupo de oligonucleótidos (*bla-KPC*; *bla-NDM*; *bla-IMP*; *bla-OXA-48*; *bla-VIM*), amplificando únicamente el gen de resistencia de interés. Para el presente estudio el uso de los oligonucleótidos reportados por Srisrattakarn *et al.* (2017), demostraron tener un buen diseño, reconociendo

únicamente la secuencia del gen *bla-KPC*. Lo que demuestra que LAMP es una técnica con características ventajosamente favorables de alta especificidad y alta eficiencia de amplificación de ADN (Notomi et al., 2000; Mori *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2008; Nkouawa, Sako, Nakao, Nakaya, & Ito, 2009). Al comparar los resultados obtenidos por LAMP con los de PCR de punto final, las cepas evaluadas muestran que el grupo con el gen *bla-KPC* tuvo amplificación positiva, generando una banda de 798pb (Anexo 15 carriles 1-6), coincidiendo con el control positivo (Anexo 15, carril 7) utilizado en el sistema de vigilancia del CRN-RAM y los reportes de Satán & Tamayo (2016), quienes fueron responsables de estandarizar el ensayo PCR en el CRN-RAM.

En el grupo con diferentes genes de resistencia a los carbapenémicos no se produjo amplificación, lo que indica que los oligonucleótidos LAMP y PCR fueron altamente específicos para reconocer únicamente la secuencia del gen *bla-KPC*.

Aunque en los resultados del gel de agarosa no se puede apreciar con claridad el bandeo característico de LAMP (Anexo 14a), la presencia del barrido evidencia una amplificación positiva y se diferencia de los resultados del grupo de cepas con diferentes genes de resistencia a carbapenémicos donde no se evidenció amplificación.

Tomita *et al.* (2008), Fischbach *et al.* (2015); Tanner, Zhang, & Evans (2015), Poole et al. (2017) y Wong, Othman, Lau, Radu, & Chee (2017), mencionan que existen otras alternativas para detectar los productos amplificados de LAMP (Anexo 16). Para contrastar el resultado obtenido por electroforesis en gel de agarosa se realizó un análisis colorimétrico mediante fluorescencia, el cual consistió en añadir 1µL de solución de SYBR Green (1/1000) (Chuva, 2017), teniendo como resultado que los tubos que contenían los productos amplificados con el gen *bla-KPC* cambiaron su coloración de naranja a verde y bajo luz UV emitieron fluorescencia (Anexo 14b).

Njiru (2012), Solanki *et al.* (2013), Cheng *et al.* (2014), Duan, Ge, *et al.* (2014), (Duan, Zhang, *et al.* (2014), Hayashida, Kajino, Hachaambwa, & Namangala (2015), Fernández-Soto *et al.* (2016), Fischbach *et al.* (2015), Srisrattakarn *et al.* (2017) y Wong *et al.* (2017), coinciden en que realizar el análisis visual es efectivo, fácil y práctico para revelar los resultados de amplificación LAMP sin necesidad de equipos costosos y especializados.

De acuerdo con la ecuación de especificidad la técnica LAMP obtuvo un 100% de efectividad identificando únicamente el gen *bla-KPC* para un tamaño de muestra de 40 cepas de las cuales 20 fueron portadoras del gen *bla-KPC* y las 20 cepas restantes fueron portadoras de otros genes de resistencia a carbapenémicos como *bla-NDM*; *bla-IMP*; *bla-OXA-48*; *bla-Ctx-m* y sin presencia de genes de resistencia (Anexo 17).

$$(1)\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos (VN)}}{\text{Falsos positivos (FP)} + \text{Verdaderos negativos(VN)}} * 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{20 \text{ (VN)}}{0 \text{ (FP)} + 20 \text{ (VN)}} * 100\% = 100\%$$

Tomado de: Ramos, 2018.

3.3.2 Determinación de la sensibilidad de LAMP.

Para determinar la sensibilidad de las técnicas LAMP y PCR de punto final primero se realizó la cuantificación de ADN. La extracción de ADN usando Kit comercial obtuvo un valor de 1.69 en la relación A260/280, indicativo de que la muestra tuvo un buen nivel de pureza, un valor de 1.30 para la relación A260/230, lo cual evidencia una cantidad importante de contaminantes producto del proceso de purificación, el tiempo empleado para purificar la muestra y de la antigüedad del kit empleado (Sandoval Rodríguez *et al.*, 2013). Teniendo como resultado 19.1µg/ml de ADN bicatenario (Tabla 14). La extracción de ADN mediante lisado térmico obtuvo un valor de 0.64

para la relación A260/280, lo cual indicó la presencia de gran cantidad de proteínas y contaminantes biológicos, a 95 °C se rompe la célula liberando el ADN junto con otras moléculas al medio, al centrifugar precipitan las moléculas con mayor peso dejando flotar en el medio a los fragmentos de ADN y algunas proteínas que interfirieron al realizar la medición a 260nm (Sandoval Rodriguez *et al.*, 2013). La relación A260/230 fue de 0.94 el cual contrasta con lo descrito anteriormente ya que reflejó una alta concentración de contaminantes en el medio como describe Alejos Velázquez *et al.* (2014). Teniendo como resultado 28.3 µg/ml de ADN bicatenario (Tabla 14).

Tabla 14: Cuantificación de ADN.

Método de extracción	Relación A260/280	Relación A260/230	Cantidad de ADN Bicatenario
Extracción por KIT	1.69	1.30	19.1 µg/ml
Extracción por Lisado térmico	0.64	0.94	28.3 µg/ml

Nota: Elaborado por: El autor, 2019.

Los resultados de sensibilidad revelan que las técnicas LAMP y PCR de punto final son capaces de detectar y amplificar ADN extraído por Kit hasta una concentración de 48.8 fg/µL (Anexo 18, carril E+). Lin *et al.* (2011), Trangoni *et al.* (2015) y Rivoarilala, Garin, Andriamahery, & Collard (2018), realizaron un ensayo comparativo entre las técnicas LAMP y PCR de punto final usando ADN extraído por Kit, demostrando que ambas técnicas fueron capaces de amplificar ADN a partir de 50 fg, similar a lo reportado en este estudio. Sin embargo, el bandeo generado por LAMP tuvo mayor intensidad con respecto a las bandas tenues de PCR usando la misma concentración de ADN (Anexo 18, calle 1, carriles D+ y E+).

Con respecto al uso de ADN extraído mediante lisado térmico los resultados revelaron que la técnica LAMP pudo detectar hasta concentraciones de 72.4 fg/ μ L correspondiente a una dilución 5^{-8} (Anexo 19, calle 1, carril E+), a diferencia de la técnica PCR de punto final que solamente generó bandas intensas hasta 45 pg/ μ L correspondiente a una dilución 5^{-4} (Anexo 19, calle 2, carril C+), en concentraciones menores las bandas generadas eran muy tenues y dificultaban la interpretación del resultado (Anexo 19, calle 2, carriles D+ y E+).

La extracción de ADN mediante este método deja una gran cantidad de impurezas que influyen de manera directa en el resultado de amplificación. Sin embargo, la cantidad de ADN que pudo detectar PCR de punto final, se encuentra dentro del rango de detección reportado por Lin *et al.* (2011), Trangoni *et al.* (2015) y Thangavelu & Devi (2018), quienes mencionan que la técnica fue capaz de amplificar ADN en el rango de 0.01 – 10000 pg.

Al utilizar la suspensión bacteriana 0.5 McFarland los resultados revelaron que la técnica LAMP fue capaz de detectar y amplificar ADN de interés a partir de 256 UFC correspondiente a una dilución 5^{-8} (Anexo 20; calle 1, carril E+), mientras que PCR de punto final para este estudio solo fue capaz de amplificar hasta $1,6 \times 10^5$ UFC correspondiente a una dilución 5^{-4} (Anexo 20; calle 2, carril C+).

Los resultados reportados en el presente estudio destacan por haber sido más sensibles que los descritos por Song *et al.* (2012), quienes reportan que LAMP tuvo una sensibilidad de 381 UFC usando muestra directa y para la técnica PCR de punto final Song *et al.* (2012) reportan que el límite fue de 3.81×10^2 UFC. Silva (2016), menciona que el límite fue de 4.4×10^0 a partir de un cultivo bacteriano puro, lo cual indica que para la técnica LAMP la pureza de la muestra de ADN no es un factor de importancia

para poder amplificar la región diana de interés, por el contrario, PCR de punto final necesita trabajar con ADN purificado para poder amplificar la región de interés sin ningún problema (Zhang *et al.*, 2011; Song, Li, Hou, Li, & Chen, 2012; Pérez-sancho *et al.* 2013). Además, LAMP puede trabajar con pequeñas concentraciones de ADN, gracias al diseño de sus oligonucleótidos, garantizando la amplificación del ADN de interés (Solanki *et al.*, 2013; Poole *et al.*, 2017; Rivoarilala *et al.*, 2018). La sensibilidad de las técnicas fue evidenciada al realizar ensayos por triplicado como se muestran en el Anexo 21. Usando la ecuación de sensibilidad la técnica LAMP obtuvo un 100% de efectividad detectando el gen *bla-KPC* en todas las cepas portadoras del mismo de un total de 40 cepas evaluadas, además, cabe mencionar que no hubo la presencia de falsos positivos, ni falsos negativos. El porcentaje de sensibilidad descrito coincide con los reportes de Zhang *et al.* (2011), Song, Li, Hou, Li, & Chen (2012) y Pérez-sancho *et al.* (2013), quienes coinciden que la técnica LAMP fue altamente sensible con rangos similares e incluso mayores que PCR de punto final.

$$(2)\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos (VP)}}{\text{Verdaderos Positivos (VP)} + \text{Falsos Positivos (FP)}} * 100\%$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{20 \text{ (VP)}}{20 \text{ (VP)} + 0 \text{ (FP)}} * 100\% = 100\%$$

Tomado de: Ramos, 2018.

Es importante mencionar que no hubo presencia de falsos positivos o falsos negativos (Tabla 15) para ambas técnicas lo cual fue garantía de fidelidad y evidencia de que los ensayos de optimización en el caso de LAMP fueron un paso importante antes de evaluar la especificidad de la técnica lo cual coincide con los reportes de Solanki *et al.* (2013), Cheng *et al.* (2014), Nakano *et al.* (2014) y Srisrattakarn *et al.* (2017), quienes mencionan que la técnica LAMP con las condiciones ideales es altamente específica reconociendo únicamente la secuencia del gen de interés.

Tabla 15: Tabla de cuatro casillas, comparación de resultados de amplificación LAMP y PCR de punto final.

Resultado de la Prueba		PCR punto Final	
		Positivo	Negativo
<i>LAMP</i>	Positivo	20 (VP)	0 (FP)
	Negativo	0 (FN)	20 (VN)

Nota: Ramos, 2018. (Modificado por: El autor).

3.4 Análisis e Interpretación de resultados.

En base a los análisis realizados en el presente estudio se pudo constatar que la técnica LAMP tuvo altos niveles de especificidad y sensibilidad hacia el gen *bla-KPC*, además, presentó varias ventajas como la amplificación bajo condiciones isotérmicas, pues no se pierde tiempo realizando cambios de temperatura y se puede realizar en equipos de fácil acceso como un baño maría o un termobloque, otra ventaja fue la rapidez, en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como PCR de punto final el uso de ADN purificado es de vital importancia para obtener resultados confiables, invirtiendo recursos, tiempo y capacitaciones, en el caso de la técnica LAMP no requiere de ADN purificado, ni grandes cantidades para generar resultados positivos (Arroyo et al., 2008; Motamedi *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2014; Fernández-Soto *et al.*, 2016), Un punto importante a destacar es que la técnica LAMP puede detectar los productos KPC a partir de muestras directas (Nakano *et al.*, 2014), debido a que LAMP es capaz de tolerar diversos inhibidores que se encuentran en muestras clínicas (Cheng *et al.*, 2014), lo que permite el uso de muestras sin previa purificación de ADN (Srisrattakarn *et al.*, 2017).

El bajo costo y la facilidad de aplicación son ventajas importantes de mencionar ya que los resultados pueden ser analizados por inspección visual, ya sea por turbidez debido a la acumulación de pirofosfatos de magnesio, fluorescencia añadiendo tintes intercalantes como SYBR Green, Calceína, etc., sin la necesidad de equipos costosos y especializados, necesitando de un espacio físico determinado para su instalación, la técnica LAMP por el contrario no requiere de sofisticados equipos para llevar a cabo una reacción convencional de amplificación, tampoco requiere un espacio físico permanente ya que por su versatilidad puede ser usada directamente en trabajos de campo, como por ejemplo en África en donde se ha usado LAMP para detectar tripanosomiasis a partir de muestras de sangre, obteniendo resultados positivos (Hayashida et al., 2015).

La técnica LAMP puede ser aplicada en muchas líneas e investigación haciendo de esta técnica una alternativa confiable para la detección de diversos patógenos como: *Mycobacterium tuberculosis* (Nliwasa et al., 2016) , *Streptococcus pneumoniae* (Wong et al., 2017), *Bordetella pertusis* (Kamachi et al., 2006), gran-negativos resistentes a carbapenémicos (Solanki et al., 2013; Cheng et al., 2014; Nakano et al., 2014; Srisrattakarn et al., 2017), *Salmonella typhis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* que son otros patógenos reportados en diversos estudios recopilados por Wong et al. (2017), diversos virus como: Goose Circovirus (Woniakowski et al., 2012); virus de la influenza aviar H5 (Imai et al., 2006); diversos miembros de la familia Geminiviridae que afectan cultivos de papa y tomate (Herrera-Vásquez et al., 2018), la lista de aplicaciones de la técnica LAMP es extensa lo que se ha mencionado es un breve repaso de su versatilidad.

Con respecto a la detección de genes de resistencia a carbapenémicos en Ecuador el primer caso reportado ocurrió en el año 2010 en un paciente de 24 años de edad, por medio de un cultivo de secreción purulenta de una herida quirúrgica, de la cual se aisló una cepa de *Klebsiella pneumoniae* y mediante un ensayo PCR se determinó genotípicamente que portaba carbapenemasa de tipo KPC-2 (Iñiguez *et al.*, 2012; Zurita *et al.*, 2013), a partir de ese momento varios equipos de salud empezaron un arduo trabajo para detectar y contener este tipo de resistencias, sin embargo la diseminación ha ido incrementando y se ha generalizado a varias casas de salud del país (Satán & Tamayo, 2016).

La técnica LAMP ha sido utilizada por Solanki *et al.* (2013), para detectar genes *bla-NDM* y *bla-KPC*, en bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos, sus resultados fueron altamente específicos, sensibles y rápidos en comparación con los obtenidos por métodos fenotípicos y PCR de punto final, sugiriendo que LAMP puede ser considerado como un ensayo de punto de corte.

Cheng *et al.* (2014), desarrollaron y evaluaron un protocolo para detectar de forma rápida genes *bla-NDM*, *bla-KPC*, *bla-IMP* y *bla-VIM*, usaron dos criterios de evaluación cualitativa, el primero fue de inspección visual por cambio de coloración y el segundo fue detección de fluorescencia a través de un turbidímetro de tiempo real, sus resultados revelaron que LAMP es una poderosa técnica para detectar todos los genes de resistencia de forma rápida con altos niveles de especificidad y sensibilidad, además, mencionan que LAMP será usada con mayor frecuencia en el diagnóstico clínico en zonas endémicas de países en vías de desarrollo.

Nakano *et al.* (2014), usaron LAMP para detectar la región homologa de todas las variantes de *bla-KPC-2* a *bla-KPC-17*, obteniendo resultados satisfactorios de especificidad

identificando solo *bla-KPC* en apenas 30 minutos con alta sensibilidad de detección, destacan que el desarrollo de nuevas metodologías que detecten productos KPC podría agilizar y facilitar la selección de una apropiada terapia antibiótica, reduciendo el tiempo de intervención, reduciendo el uso inadecuado y convirtiéndose en un método esencial de monitoreo y prevención de transmisión de infecciones.

Srisrattakarn *et al.* (2017), usaron LAMP con azul de hidroxinaftol (HNB por sus siglas en inglés) “LAMP-HNB”, para detectar varios genes de resistencia *bla-NDM*, *bla-OXA-48*, *bla-KPC*, *bla-IMP-14* y *bla-VIM*, sus resultados demostraron que LAMP tuvo excelente especificidad y una sensibilidad mayor que PCR de punto final, usando solamente un baño maría convencional, sugiriendo que la metodología podría ser usada como prueba rutinaria de confirmación de carbapenemasas en laboratorios o para propósitos epidemiológicos.

A medida que la tecnología se ha ido desarrollando, los microorganismos también han aumentado su capacidad de virulencia haciéndose más resistentes a los antibióticos de última generación, pruebas de rutina como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta para el diagnóstico clínico, sin embargo, su alto costo debido al equipamiento utilizado y el tiempo que emplea para obtener resultados son una de sus principales desventajas (Solanki et al., 2013; Cheng et al., 2014; Nakano et al., 2014; Srisrattakarn et al., 2017). La OMS destaca la importancia de pruebas de diagnóstico confiables, rápidas, sensibles y específicas que ayuden en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en países que están en vías de desarrollo, siendo LAMP una alternativa como se ha demostrado en el presente estudio que pueda incorporarse como prueba de rutina en laboratorios ayudando dirigir una terapia pronta y eficaz (Arroyo et al., 2008).

Conclusiones

La temperatura isotérmica de incubación elegida fue 63 °C obteniendo buenos resultados de amplificación, sin embargo, la amplificación se puede dar en el rango de temperaturas de 56 – 65 °C.

El usar una temperatura constante para poder amplificar ADN representa una ventaja importante con respecto a otras técnicas que necesitan realizar una desnaturalización inicial con temperaturas altas y luego continuar con temperaturas bajas repitiendo esto en varios ciclos para poder amplificar ADN.

La presencia de todos los grupos de oligonucleótidos LAMP garantizó la amplificación del gen de interés, usando una concentración mínima de oligonucleótidos FIB/BIP 0,4 µM los resultados revelaron buen bandeo y baja presencia de estructuras secundarias.

La detección visual por turbidez se dio al agregar de 4-6 mM de MgSO₄, sin embargo, LAMP puede amplificar ADN a partir de 2 mM, pero sin generar gran cantidad de turbidez.

El uso de 0.8 M de betaína garantizó la accesibilidad de la ADN polimerasa a las regiones del ADN diana, aumentó la velocidad general de la reacción, la selectividad de los oligonucleótidos hacia la región de interés y evitó la amplificación de secuencias inespecíficas.

La pureza de la muestra de ADN suele ser un factor clave para garantizar buenos resultados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como PCR, sin embargo, los resultados de este estudio demostraron que para la técnica LAMP la pureza de la muestra no fue un inconveniente para amplificar ADN teniendo alta especificidad y sensibilidad (>99%) para reconocer únicamente la secuencia del gen de interés, incluso mayor que la técnica PCR de punto final.

Recomendaciones

Se recomienda siempre realizar ensayos de control de calidad de reactivos como punto de partida para garantizar el éxito de la investigación.

Se recomienda realizar alícuotas de cada reactivo, tomando en cuenta la número de reacciones a realizarse por día y semana, de esta forma se evitará que la solución madre se contamine o pierda sus propiedades fisicoquímicas por reiterados periodos de descongelamiento.

Se recomienda realizar ensayos de optimización para encontrar las concentraciones y condiciones ideales para la reacción de amplificación LAMP.

Bibliografía

- Ahmed, A., Ibrahim, F., Mukim, S., Xiu, K., Mohktar, M. S., Madou, M., & Lin, K. (2016). A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 227, 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.116>
- Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. del C., & Cornejo Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In *HERRAMEINTAS MOLECULARES APLICADAS EN ECONLOGÍA* (Primera Ed). México D.F.: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Algorta, G. (2001). Bacilos Gram Negativos No Exigentes. Retrieved from <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 22.pdf>
- Ali, M. M., & Subhan, S. (2016). Molecular Characterization of Antibiotic Resistance Pattern among Gram Negative Bacteria Isolated from Red Meat in Karachi. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 2(5), 1–7. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.02.00039>
- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- AlTamimi, M., AlSalamah, A., AlKhulaifi, M., & AlAjlan, H. (2017). Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by Enterobacteriaceae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.07.004>
- Aquili, V. (2009). “Caracterización de cepas de *Escherichia coli* con fenotipos de multirresistencia inducidos o seleccionados in vitro con antimicrobianos o con

fármacos no antimicrobianos.” UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=77054>

Arroyo, M., Morales, G., Sosa, P., Carmona, J., & Maestre, A. (2008). Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica. *Medicas UIS*, 21, 158–175.

Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2012). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.011>

Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol). *Avances En Biomedica*, 3(1), 25–33. Retrieved from <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/biomedicina/article/view/4584>

Bush, K., Palzkil, T., & Jacoby, G. (2017). β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Retrieved from <https://www.lahey.org/Studies/>

Bush, K., Palzkill, T., & Jacoby, G. (2017). β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Retrieved from <https://www.lahey.org/Studies/>

Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. In *Siemc* (Vol. 29, p. 14,15). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>

- Canene-Adams, K. (2013). General PCR. In J. Albeson & M. Simon (Eds.), *Methods in Enzymology* (1ra Edició, Vol. 529, pp. 291–299).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416617-2.09985-9>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 298–304.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- Cheng, C., Zheng, F., & Rui, Y. (2014). Rapid Detection of *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} Carbapenemase Genes in Bacteria by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Microbial Drug Resistance*, 20(6), 533–538.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0040>
- Chuva Coyago, D. A. (2017). *IMPLEMENTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR UN LAZO (LAMP) PARA DETECCIÓN DE BRUCELLA ABORTUS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE BOVINOS*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca.
 Retrieved from [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28477/3/Trabajo de titulación..pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28477/3/Trabajo%20de%20titulaci3n..pdf)
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Cubero, M. (2015). *Epidemiología molecular, factores de virulencia y*

caracterización de los mecanismos de resistencia de Klebsiella pneumoniae.

Retrieved from

http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/101727/1/MCG_TESIS.pdf

Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in bla KPC gene mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5370–5373. <https://doi.org/10.1128/AAC.05202-11>

De la Rosa, M., Prieto, J., & Navarro, J. M. (2011). *Microbiología en ciencias de la salud Conceptos y aplicaciones* (3ra Edició). Barcelona: Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Del Franco, M., Paone, L., Novati, R., Giacomazzi, C. G., Bagattini, M., Galotto, C., ... Zarrilli, R. (2015). Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae clonal complex 101 (ST101 and ST1789). *BMC Microbiology*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0597-z>

Del Franco, M. T., Paone, L., Novati, R., Giacomazzi, C. G., Bagattini, M., Galotto, C., ... Zarrilli, R. (2015). Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae clonal complex 101 (ST101 and ST1789). *BMC Microbiology*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0597-z>

Duan, Y., Ge, C., Zhang, X., Wang, J., & Zhou, M. (2014). Development and Evaluation of a Novel and Rapid Detection Assay for Botrytis cinerea Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE*, 9(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111094>

- Duan, Y., Zhang, X., Ge, C., Wang, Y., Cao, J., Jia, X., ... Zhou, M. (2014). Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep07094>
- Eiken Chemical Co., L. (2006). A Guide to LAMP primer designing (V4). Retrieved from papers2://publication/uuid/C0EE1B82-E952-4776-A601-A3BAEC22F0CC
- Escandón-Vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S., & Villegas, M. (2017). Expert Review of Anti-infective Therapy The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7210. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>
- Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Fariñas, M. C., & Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Fernández-Soto, P., Sánchez-Hernández, A., Gandasegui, J., Bajo Santos, C., López-Abán, J., Saugar, J. M., ... Muro, A. (2016). Strong-LAMP: A LAMP Assay for

- Strongyloides spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004836>
- Ferrer, E. (2015). Artículo de Revisión Biomedicina. Técnicas Moleculares para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Universidad de Oriente, Venezuela*, 27(3), 359–371. <https://doi.org/ISSN: 1315-0162>
- Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M., & Glokler, J. F. (2015). Shining a light on LAMP assays- a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*, 58(4), 189–194. <https://doi.org/10.2144/000114275>
- Frieden, T. (2013). Antibiotic Resistance Threats. *Cdc*, 22–50. <https://doi.org/CS239559-B>
- Gómara-Lomero, M. M., López-Calleja, A. I., Vela, M. B., Ferrer Cerón, I., Rezusta López, A., & Revillo Pinilla, M. J. (2017). Detection of carbapenemases and other mechanisms of enzymatic resistance to B-lactams in Enterobacteriaceae with diminished susceptibility to carbapenems in a tertiary care hospital. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.07.006>
- Gomes de Oliveira, K., Borba, J. C., Melo Bailão, A., de Almeida Soares, C. M., Carrilho, E., & Rodrigues Mendes Duarte, G. (2017). Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. *Analytical Biochemistry*, 534, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.014>
- Gootz, T. D., Lescoe, M. K., Dib-Hajj, F., Dougherty, B. A., He, W., Della-Latta, P., & Huard, R. C. (2009). Genetic organization of transposase regions surrounding

- blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1998–2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.01355-08>
- Hammoudi, D., Ayoub Moubareck, C., & Karam Sarkis, D. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009>
- Hayashida, K., Kajino, K., Hachaambwa, L., & Namangala, B. (2015). Direct Blood Dry LAMP : A Rapid , Stable , and Easy Diagnostic Tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003578>
- Herrera-Vásquez, J. A., Puchades, A. V., Elvira-González, L., Jaén-Sanjur, J. N., Carpino, C., Rubio, L., & Galipienso, L. (2018). Fast detection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the three begomovirus species infecting tomato in Panama. *European Journal of Plant Pathology*, 151(1), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1358-7>
- Hong, S. K., Yong, D., Kim, K., Hong, S. S., Hong, S. G., Khosbayan, T., ... Chong, Y. (2013). First outbreak of kpc-2-producing *klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in a hospital in south korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3877–3879. <https://doi.org/10.1128/JCM.01730-13>
- Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Notomi, T., Ishizaki, T., Tashiro, M., & Odagiri, T. (2006). Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, 24(44–46), 6679–6682. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.046>

- Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A., & Maldonado, L. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa tipo KPC: Primer Reporte en el Ecuador. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas*, 37(October), 39–42.
- Itonaga, M., Matsuzaki, I., Warigaya, K., Tamura, T., Shimizu, Y., Fujimoto, M., ... Murata, S. ichi. (2016). Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE*, 11(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151654>
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C. R., ... Lee, S. H. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9654–9692. <https://doi.org/10.3390/ijms16059654>
- Ji, H., Haitao-Li, Zhu, L., Zhang, H., Wang, Y., Zuo, Z., ... Xu, Z. (2012). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *actinobacillus pleuropneumoniae* based the dsbE-like gene. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32(8), 757–760. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800014>
- Kamachi, K., Toyozumi-ajisaka, H., Toda, K., Soeung, S. C., Sarath, S., Nareth, Y., ... Arakawa, Y. (2006). Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1899–1902. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1899>
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods.

Frontiers in Microbiology, 7(JUN), 1–30.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>

Lin, G., Zheng, F., Zhou, J., Gong, X., Wang, G., Cao, X., & Qiu, C. (2011). Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the omp25 gene for rapid detection of *Brucella* spp. *Molecular and Cellular Probes*, 25(2–3), 126–129.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.001>

Livermore, D. M. (2012). Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram Negative.pdf. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 27, 128–142.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128>

López, L., & Almirante, B. (2014). Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Reservoirs and transmission mechanisms. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(S4), 10–16.
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70169-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70169-7)

López, L., & Mejía, C. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos Evaluation of DNA extraction methods for detection of *Listeria monocytogenes* in meat products. *Revista MVZ CÓRDOBA*, 17(3), 3169–3175. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v17n3/v17n3a11.pdf>

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 3–14. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia

- bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Martzy, R., Kolm, C., Brunner, K., Mach, R. L., Krska, R., Šinkovec, H., ... Reischer, G. H. (2017). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water. *Water Research*, 122, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.023>
- Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.*, 69(2), 185–192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
- Moreno, K. (2013). Carbapenémicos : Tipos y mecanismos de resistencias bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*, (608), 599–605. Retrieved from <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenI.cgi?IDARTICULO=47783>
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1), 150–154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>
- Motamedi, M. K., Saghafinia, M., Karami, A., & Gill, P. (2011). A review of the current isothermal amplification techniques: Applications, advantages and

- disadvantages. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(3), 293.
<https://doi.org/10.4103/0974-777X.83538>
- Muñoz-Price, S., Kumaradamy, K., Hayden, M., Gniadkowski, M., Garau, J., Cornaglia, G., ... Quinn, J. P. (2013). HHS Public Access, 13(9), 785–796.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).Clinical
- Mwendwa, F., Mbae, C. K., Kinyua, J., Mulinge, E., Mburugu, G. N., & Njiru, Z. K. (2017). Stem loop-mediated isothermal amplification test: comparative analysis with classical LAMP and PCR in detection of *Entamoeba histolytica* in Kenya. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2466-3>
- Nakano, R., Nakano, A., Ishii, Y., Ubagai, T., Kikuchi-Ueda, T., Kikuchi, H., ... Ono, Y. (2014). Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21(3), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.11.010>
- Njiru, Z. K. (2012). Loop-mediated isothermal amplification technology: Towards point of care diagnostics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), 1–4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001572>
- Nkouawa, A., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., & Ito, A. (2009). Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Differentiation and Rapid Detection of *Taenia* Species □. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 168–174.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01573-08>
- Nliwasa, M., Macpherson, P., Chisala, P., Kamdolozi, M., Khundi, M., Kaswaswa, K., ... Msefula, C. (2016). The Sensitivity and Specificity of Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Tuberculosis Diagnosis in Adults with Chronic Cough in Malawi. *PLoS ONE*, 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155101>

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- OMS. (2017). Resistencia a los antibióticos. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Pardo-Lledías, J., Campo-Núñez, A., Galindo-Pérez, I., Velasco-Tirado, V., Argenta-Fernández, S., & Belhanssen-Garcia, M. (2017). *Infecciones importadas en España: revisión del diagnóstico microbiológico*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/317565951>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Pena, I. (2015). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
- Pérez-sancho, M., García-seco, T., Arrogante, L., García, N., Martínez, I., & Diez-guerrier, A. (2013). Development and evaluation of an IS 711 -based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp . on clinical samples. *Research Un Veterinary Science*.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.002>

Poole, C. B., Li, Z., Alhassan, A., Guelig, D., Diesburg, S., Tanner, N. A., ... Carlow, C. K. S. (2017). Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using noninstrumented Nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). *PLoS ONE*, 12(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169011>

Puerta, A., & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–31.
[https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)

Ramirez, D. (2016). Mecanismos de intercambio de material genético en bacterias. Retrieved from <https://example85201.wordpress.com/2016/11/20/mecanismo-de-intercambio-de-material-genetico-en-bacterias/>

Ramos Sarmiento, D. A. (2018). *WESTERN BLOT COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA HIDATIDOSIS HUMANA, UTILIZANDO FLUIDO DEL METACESTODO DE Echinococcus sp.* UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15339/1/UPS-QT12480.pdf>

Ranjbar, R., & Afshar, D. (2015). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Yersinia enterocolitica* via targeting a conserved locus. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(4), 185–190.

Rivoarilala, O. L., Garin, B., Andriamahery, F., & Collard, J. M. (2018). Rapid in vitro detection of CTX-M groups 1, 2, 8, 9 resistance genes by LAMP assays. *PLoS ONE*, 13(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200421>

Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014).

Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas*, 2, 127–140.

Sandoval Rodriguez, A. S., Martinez Rizo, A. B., & López de de la Mora, D. A. (2013). Métodos de extracción de ácido nucleicos. In J. León Fraga (Ed.), *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (Primera Ed, pp. 104–106). México D.F.: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.

Satán, C., & Tamayo, R. (2016). *Epidemiología molecular de Klebsiella pneumoniae productora del gen blaKPC, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en cepas de muestras invasivas analizadas en el INSPI-Quito en el periodo 2013-2014*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/11413>

Sekyere, J. O., Govinden, U., & Essack, S. Y. (2015). Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 1219–1233. <https://doi.org/10.1111/jam.12918>

Sema, M., Alemu, A., Bayih, A. G., Getie, S., Getnet, G., Guelig, D., ... Pillai, D. R. (2015). Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia. *Malaria Journal*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0559-9>

Sepúlveda, C. P. (2013). *Camila paz sepúlveda ansaldo*. Universidad de Chile. Universidad de Chile. Retrieved from

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132082/Comparación-de-la-inhibición-de-la-reacción-en-cadena-de-la-polimerasa-según-la-extracción-de-DNA-de-Cryptosporidium-spp.pdf?sequence=1>

Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2008). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología* (1ra Edición, pp. 53–74). México D.F.: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT). Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>

Silva Urzúa, I. A. (2016). *SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE UNA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CONVENCIONAL, PARA EL DIAGNOSTICO DE Brucella canis EN CULTIVO PURO Y MUESTRAS DE SANGRE Y ORINA*. Universidad de Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/143671>

Solanki, R., Vanjari, L., Ede, N., Gungi, A., Soory, A., & Vemu, L. (2013). Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of blaNDM-1 and blaKPC genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART10), 1540–1544. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.059907-0>

Song, L., Li, J., Hou, S., Li, X., & Chen, S. (2012). Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples. *Journal of Microbiological Methods*, 90(3), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.024>

Srisrattakarn, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L.,

- Saenjamla, P., ... Chanawong, A. (2017). Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla NDM, bla OXA-48, bla VIM, bla IMP-14 and bla KPC groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J Microbiol Biotechnology*, 33(7), 130. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2295-5>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Suwancharoen, D., Sittwicheanwong, B., & Wiratsudakul, A. (2016). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for pathogenic *Leptospira* spp. detection with leptospire isolation and real-time PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(8), 1299–1302. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0702>
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), 217–226. https://doi.org/http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf
- Tanner, N. A., & Evans, T. C. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Nucleic Acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, (January), 15.14.1-15.14.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68.

<https://doi.org/10.2144/000114253>

Thangavelu, R., & Devi, P. G. (2018). Rapid and sensitive detection of *Pseudocercospora eumusae* pathogen causing eumusae leaf spot disease of banana by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *3 Biotech*, 8(10), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1468-8>

ThermoFisher. (2018). PCR Setup—Six Critical Components to Consider. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>

Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). *Microbiología médica. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>

Trangoni, M. D., Gioffré, A. K., Cerón Cucchi, M. E., Caimi, K. C., Ruybal, P., Zumárraga, M. J., & Cravero, S. L. (2015). LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 619–626. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220131206>

Vignoli, R., & Seija, V. (2000). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Book*, 649–662.

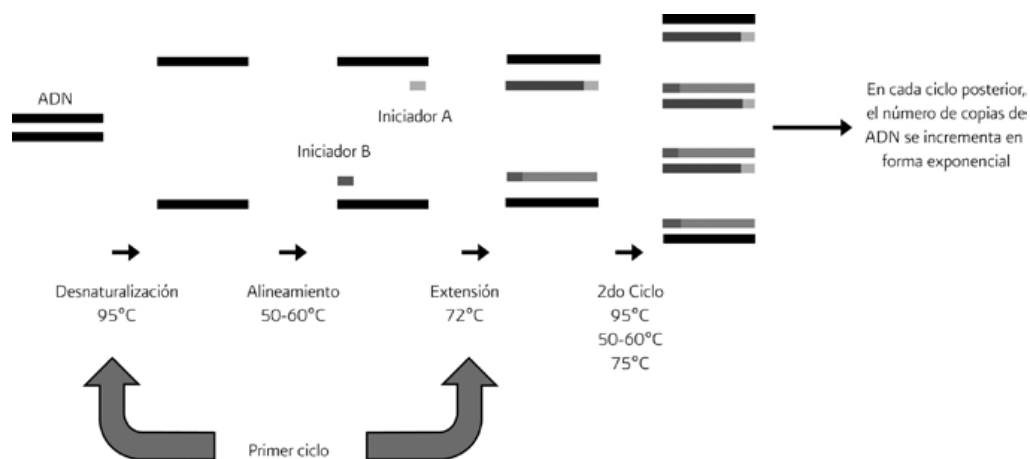
Wong, Y., Othman, S., Lau, Y., Radu, S., & Chee, H. (2017). Loop Mediated

- Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Microorganisms Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, (November). <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Woniakowski, G., Kozdruń, W., & Samorek-Salamonowicz, E. (2012). Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virology Journal*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-110>
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736–755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Zárate, M. S., Romano, V., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 98–102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)
- Zhang, C., Yao, Y., Zhu, J. L., Zhang, S. N., Zhang, S. S., Wei, H., ... Cui, Y. L. (2016). Establishment and application of a real-time loop-mediated isothermal amplification system for the detection of CYP2C19 polymorphisms. *Scientific Reports*, 6(March), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep26533>
- Zhang, J., Zhang, G. H., Yang, L., Huang, R., Zhang, Y., Jia, K., ... Li, S. J. (2011). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Journal*, 187(3), 393–396. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.001>
- Zurita, J., Alcocer, I., Ortega-Paredes, D., Barba, P., Yauri, F., Iñiguez, D., & Mora,

M. (2013). Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(4), 229–230. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.06.001>

Anexos

Anexo 1: Esquema de Amplificación de ADN mediante PCR

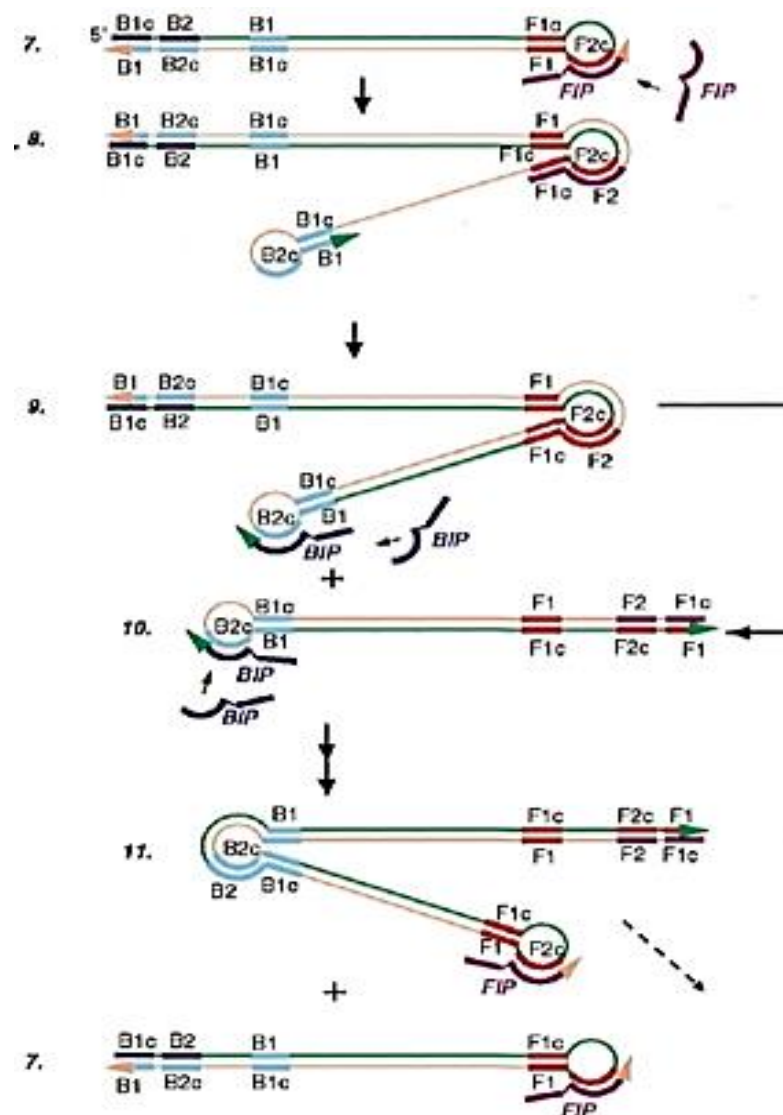


Amplificación de ADN mediante PCR:

Cada ciclo de amplificación PCR consta de tres etapas: Desnaturalización: donde se produce la separación de las hebras de ADN a 95 °C, Alineamiento: la temperatura desciende (50-60 °C) y los iniciadores se unen a la secuencia complementaria de ADN molde; Extensión: ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena de AND por adición de nucleótidos. El proceso se repite por 30 ciclos generando alrededor de dos millones de copias de ADN a partir de una sola molécula (Serrato et al., 2008).

Nota: Tomado de: (Serrato *et al.*, 2008) *PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA*

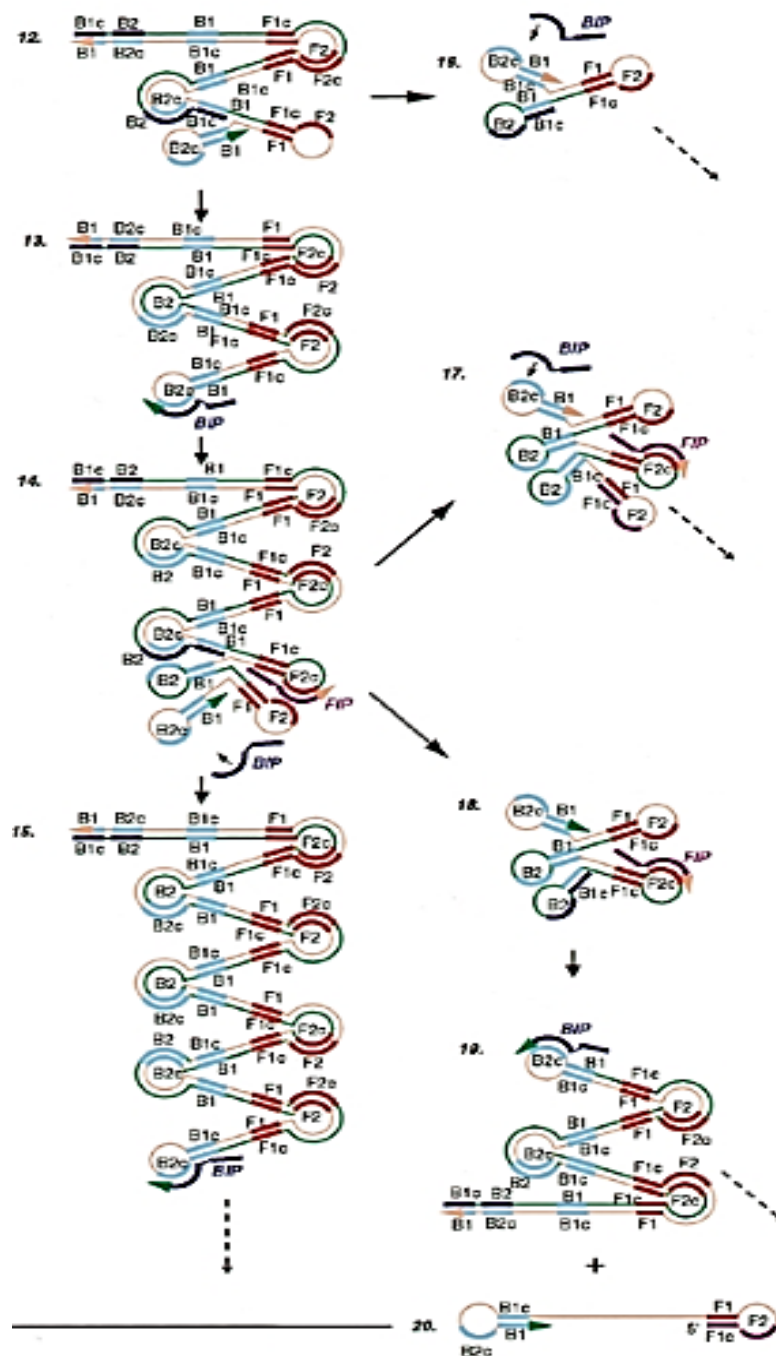
Anexo 2b. Que la imagen no cubra el margen



Una vez formada la estructura con secuencias complementarias a los dos extremos que forman un lazo, se usa como material de inicio para los ciclos de amplificación LAMP. El primer ciclo comienza con la unión de FIP a la estructura tipo lazo (paso 7), generando un bucle intermedio unido a una copia invertida de la secuencia de ADN que servirá de unión a BIP (paso 8 y 9). La siguiente síntesis de ADN se genera de manera automática debido al diseño de los primers internos, produciendo una estructura complementaria del ADN original de tallo-lazo (paso 10 y 11) (Notomi et al., 2000).

Nota: Tomado de (Notomi et al., 2000). *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*.

Anexo 2c.



Las estructuras formadas en el paso 11 permiten los ciclos de amplificación se repitan de forma constante, amplificando la secuencia diana 3 veces cada medio ciclo. Los productos finales de la amplificación son una mezcla de estructuras tallo-lazo con estructuras en forma de coliflor (formados por múltiples lazos que contienen secuencias invertidas e iguales al ADN diana) que se amplifican de manera constante una y otra vez hasta el término de la reacción (paso 16-18) (Notomi et al., 2000).

Nota: Tomado de (Notomi et al., 2000). *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*

Anexo 2: Características Bioquímicas de algunas Enterobacterias.

	<i>Klebsiella</i>		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>		<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>		<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>		
Indol	-	+	+	-	-	+	-
Rojo Metilo	-	V	+	-	-	+	-
Voges-Proskauter	+	+	-	+	+	-	+
Citrato	+	+	-	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	-	-	+
Urea	+	+	-	V	V	V	-
Lactosa	+	+	+	+	+	V	-
Motilidad	-	-	V	+	+	+	+
Ornitrina descarboxilasa	-	-	+	+	+	V	+
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	+	V	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+

Nota: V: resultado variable; +: resultado positivo; -: resultado negativo; ONPG: O-nitrofenilgalactopianísido; Cubero, 2015. (Modificado por: El autor, 2019).

Anexo 3: Reactivos utilizados en la reacción de amplificación LAMP.

Componentes de la reacción de amplificación LAMP		
Reactivo	# Catalogo	Características
Enzima <i>Bst</i> ADN Polimerasa	Lucigen, Cat No: 30027-1, lot:11975	Actividad de desplazamiento en cadena de fragmento largo y características isotérmicas de amplificación.
Buffer de amplificación 10X	Lucigen, Cat No: 30027-1, lot:11975	200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , and 0.1 % Triton X-100. Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la AND polimerasa
Oligonucleótidos LAMP	Macrogen, OG170929-158	Descritos por Srisrattakarn et al. (2017), reconocer un total de seis secuencias distintas de ADN blanco.
FIP	GCG TAC ACA CCG ATG GAG CCG CCT TTT CCA ACC TCG TCG CGG AAC CAT	
BIP	GGC TCA GGC GCA ACT GTA AGT TAC TTT TGC AGC AAG AAA GCC CTT GAA TGA G	
F3	GGC TGG CTT TTC TGC CAC CG	
B3	GGC TGC GAG CCA GCA CAG C	
FLP	AGT CCT GTT CGA GTT TAG CGA	
BLP	CTG AGG AGC GCT TCC CAC TG	
Betaína 5 M	Sigma, Cat. No: B0300-1VL, lot: SLBW8334	Incrementa la sensibilidad de los oligonucleótidos hacia las regiones diana evitando amplificaciones inespecíficas.
Solución de Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTPS)	Invitrogen, Cat. No.: 10297-018	Favorecen el proceso de extensión de las nuevas hebras de ADN.
Donador de Mg ²⁺ , MgSO ₄ 1 M	Sigma Cat. No: M3409-10X 1mL	Necesario para la actividad enzimática de la ADN polimerasa.
Donador de Mg ²⁺ , MgCl ₂ 1 M	Invitrogen, Cat. No.: AM9530G	Necesario para la actividad enzimática de la ADN polimerasa.
Control positivo	ATCC 1705 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amplifica para <i>bla-KPC</i> , proporcionado por el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM.
Control negativo	Buffer Te 1X	10 Mm Tris HCl, 1 Mm EDTA pH= 8.0 Preparado en el laboratorio de biología molecular del CRN-RAM.

Nota: Creado por: El autor, 2019.

Anexo 4: Grupos de oligonucleótidos LAMP.

Grupo 1:						
<i>Evaluation of LAMP assay using phenotypic test and conventional PCR for detection of bla-NDM-1 and bla-KPC genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates (Solanki et al., 2013).</i>						
	Secuencias		Long	Tm	%GC	ΔG
FIP	F1c	5'-CACAGTGGGAAGCGCTCCTC-3'	20	71.8	65	-1.95
	F2	5'-GTGTACGCGATGGATACCG-3'	19	66.6	57.9	
BIP	B1c	5'-TCAAGGGCTTTCTTGCTGCCG-3'	21	72.5	57.1	-0.05
	B2	5'-CGTAACGGATGGGTGTGTC-3'	19	66.8	57.1	
F3	5'-TCGAACAGGACTTTGGCG-3'		18	66.3	55.6	0.40
B3	5'-GGAACCAGCGCATTTTGC-3'		19	67.3	52.6	-1.43
FLP	5'-TAACTACAGTTGCGCCTGAGC-3'		21	69.2	52.4	-1.21
BLP	5'-AGCAGCAGGCCGGCTTGCTG-3'		20	77.4	70	-4.25
Grupo 2:						
<i>Rapid detection of the Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Nakano et al., 2014).</i>						
	Secuencias		Long.	Tm	%GC	ΔG
FIP	F1c	5'-AGCCGCCAAAGTCTGTTCGAG-3'	21	71.8	57.1	-1.31
	F2	5'-CCACGCGCTGACCAA-3'	16	68.8	68.8	
BIP	B1c	5'-CATCGGTGTGTACGCGATG-3'	19	67.5	57.9	-4.20
	B2	5'-AGCTGCACAGTGGGAAG-3'	17	65.6	58.8	
F3	5'-CGCTGGCTGGCTTTCTG-3'		18	68.1	61.1	-0.42
B3	5'-CACAGCGGCAGCAAGAA-3'		17	67	58.8	-1.14
BLP	5'-GGCGCAACTGTAAGTTACCG-3'		20	67.9	55	-2.08
Grupo 3:						
<i>Rapid detection of bla-NDM, bla-KPC, bla-IMP and bla-VIM Carbapenemase Genes in Bacteria by Loop-Mediated Isothermal Amplification (Cheng et al., 2014)</i>						
	Secuencias		Long.	Tm	%GC	ΔG
FIP	F1c	5'-AATGGTTCCGCGACGAGG-3'	18	68.8	61.1	-2.51
	F2	5'-CTGTCTTGTCTCTCATGGC-3'	19	63.9	52.6	
BIP	B1c	5'-GGACTTTGGCGGCTCCAT-3'	18	69	61.1	-2.51
	B2	5'-GCGCGGTAACCTACAGTT-3'	18	64	50	
F3	5'-GTATCGCCGTCTAGTTCTG-3'		19	63.4	52.6	2.09
B3	5'-TGAATGAGCTGCACAGTG-3'		18	64	50	0.38
FLP	5'-GGCAGAAAAGCCAGCCAG-3'		18	67.8	61.1	-1.90

BLP	5'-CGATGGATACCGGCTCAG-3'	18	65.7	61.1	0.94
Grupo 4:					
<i>Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla_{NDM}, bla_{OXA}, bla_{VIM}, bla_{IMP-14} and bla_{KPC} groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. (Srisrattakarn et al., 2017).</i>					
	Secuencias	Long.	Tm	%GC	ΔG
FIP	F1c 5'-GCGTACACACCGATGGAGCCGCC-3'	23	78.6	69.6	-5.09
	F2 5'-CCAACCTCGTCGCGGAACCAT-3'	21	73.9	61.9	
BIP	B1c 5'-GGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTAC-3'	24	72.6	54.2	-4.80
	B2 5'-GCAGCAAGAAAGCCCTTGAAATGAG-3'	24	71.4	50	
F3	5'-GGCTGGCTTTTCTGCCACCG-3'	19	73.4	68.4	-2.41
B3	5'-GGCTGCGAGCCAGCACAGC-3'	19	73.7	73.7	-3.05
FLP	5'-AGTCCTGTTTCGAGTTAGCGA-3'	21	67.8	47.6	-0.17
BLP	5'-CTGAGGAGCGCTTCCCACTG-3'	20	71.5	65	-1.23

Nota: Creado por: El autor, 2019.

Anexo 5: Cepas bacterianas seleccionadas.

#Cepa	Año	Código INSPI	Microorganismo	Confirmación Resistencia				
				Fenotípico				Genotípico
				Sinergia BLEE	Sinergia APB	Sinergia EDTA	Sinergia AmpC	PCR
1	2013	INSPI G13-20/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(+)	(-)	(+)	<i>bla-KPC</i> +
2	2013	HBO13-193/3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>bla-KPC</i> +
3	2013	HBO13-278/5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
4	2014	HVC14-178/14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>bla-KPC</i> +
5	2014	HMI14-550/29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
6	2014	HEE14-552/56	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
7	2014	HBO14-445/47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
8	2016	HEG1389-1216RAM-Q	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
9	2017	HBO-0113-0117RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
10	2017	HEE0181-0217RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
11	2017	HEE0265-0317RAM-Q	<i>Citrobacter Freundii</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
12	2017	NLB0344-0317RAM-Q	<i>Enterobacter aerogenes</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
13	2017	HDC0504-0417RAM-Q	<i>Serratia marcescens</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
14	2017	HEE0560-0417RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
15	2017	HSF0768-0617RAM-Q	<i>Serratia marcescens</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
16	2017	HSQ0854-0617RAM-Q	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
17	2017	HGM0901-0717RAM-Q	<i>Klebsiella oxytoca</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
18	2017	HEE0942-0717RAM-Q	<i>Citrobacter Freundii</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
19	2017	HEE0988-0717RAM-Q	<i>Klebsiella oxytoca</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +
20		1705	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla-KPC</i> +

Continuación Anexo 6

21	2016	HEE1324-1116RAM-Q	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>OXA</i> 48 +
22	2017	HEE0003-0117RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>BLEE</i>
23	2017	HEG0086-0117RAM-Q	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>BLEE</i>
24	2017	HEE0128-0117RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>Ctx-m</i> +
25	2017	HBO0195-0217RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>Ctx-m</i> +
26	2017	HBO0229-0217RAM-Q	<i>Serratia marcescens</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Bla</i> - <i>KPC</i> -
27	2017	NBL0280-0317RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
28	2017	HNA0290-0317RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
29	2017	HNA0417-0317RAM-Q	<i>Serratia marcescens</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>BLEE</i>
30	2017	HNA0419-0317RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>BLEE</i>
31	2017	HEE0566-0417RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
32	2017	HBO0585-0517RAM-Q	<i>Serratia marcescens</i>	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>bla</i> - <i>IMP</i> +
33	2017	ING0642-0517RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
34	2017	HEE0665-0517RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
35	2017	HEE0780-0617RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>bla</i> - <i>NDM</i> +
36	2017	HDV0786-0617RAM-Q	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
37	2017	HEE0814-0617RAM-Q	<i>Enterobacter cloacae</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
38	2017	HEE0831-0617RAM-Q	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>bla</i> - <i>NDM</i> +
39	2017	HCA0981-0717RAM-Q	<i>Serratia marcescens</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>bla</i> - <i>KPC</i> -
40	2017	HEE1027-0717RAM-Q	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>bla</i> - <i>NDM</i> +

Nota: BLEE (Betactamasas de Espectro Extendido); APB (Ácido 3-fenil-Borónico); EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético); AmpC (Serin-betactamasas/grupo 1 clasificación Bush-Jacoby); *bla*-*KPC* (Betactamasa *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa); *bla*-*OXA*-48 (Carbapenemasas de clase D “oxacilinasas”); *bla*-*IMP* (Betactamasa Imipenemasa); *bla*-*NDM* (Metalobetactamasa Nueva Deli); *bla*-*Ctx-m* (BLEE tipo Ctx-m).

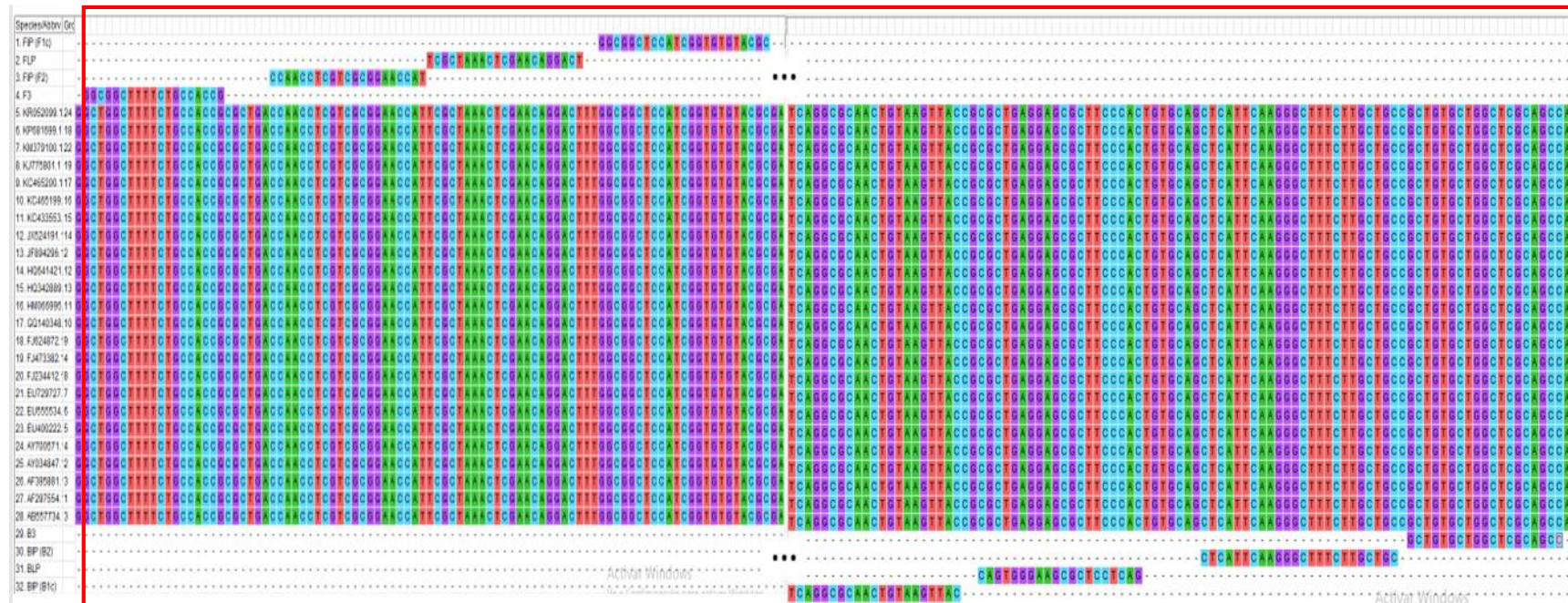
Creado por: El autor, 2019.

Anexo 6: Variantes del gen *bla-KPC*.

Enzima	# Acceso	Microorganismo	Tamaño	Fuente	%GC
KPC - 1	AF297554	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1377 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	60,28
KPC - 2	JF894296	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	834 pb	(Cheng <i>et al.</i> , 2014)	62,35
	AY034847	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	918 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,11
KPC - 3	AB557734	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1677 pb	(Nakano <i>et al.</i> , 2014) Plásmido pKYSKPC	59,75
	AF395881	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	960 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	60,94
KPC - 4	AY700571	<i>Enterobacter sp.</i>	881 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,63
	FJ473382	<i>Enterobacter cancergenus</i>	1276 pb	(Nakano <i>et al.</i> , 2014)	60,42
KPC - 5	EU400222	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3072 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	60,64
KPC - 6	EU555534	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,56
KPC - 7	EU729727	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,22
KPC - 8	FJ234412	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,45
KPC - 9	FJ624872	<i>Escherichia coli</i>	854 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,94
KPC - 10	GQ140348	<i>Acinetobacter baumannii</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,34
KPC - 11	HM066995	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,34
KPC - 12	HQ641421	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,34
KPC - 13	HQ342889	<i>Enterobacter cloacae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,34
KPC - 14	JX524191	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1705 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	59,77
KPC - 15	KC433553	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	60,77
KPC - 16	KC465199	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,34
KPC - 17	KC465200	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,34
KPC - 18	KP681699	<i>Escherichia coli</i>	960 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	60,94
KPC - 19	KJ775801	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,45
KPC - 22	KM379100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	882 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	61,68
KPC - 24	KR052099	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9835 pb	(Bush, Palzkil, et al., 2017)	54,25

Nota: Creado por: El autor, 2019.

Anexo 7: Alineamiento de oligonucleótidos LAMP.

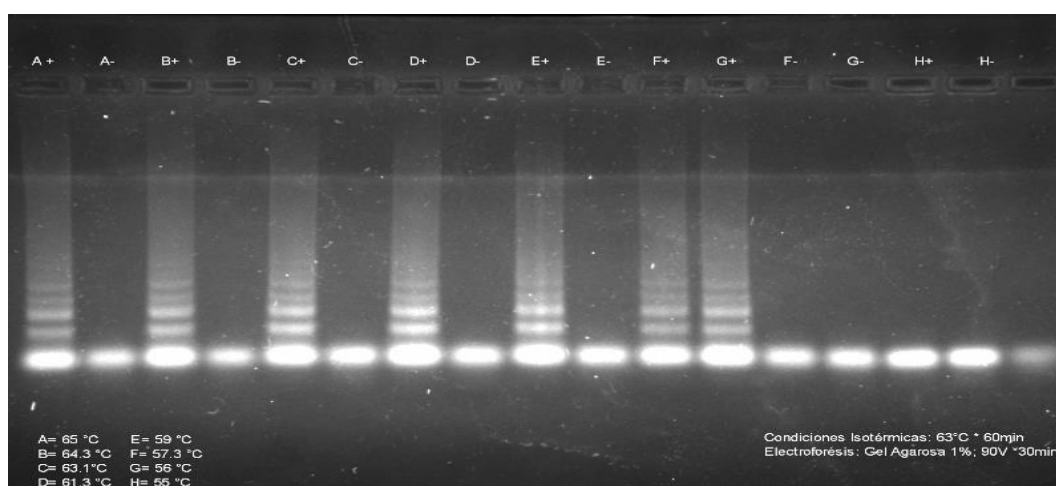


..

Nota: Alineamiento de oligonucleótidos descritos por Srisrattakarn *et al.*, 2017 a las diferentes variantes de gen *bla-KPC*; Creado por: El autor, 2019.

Anexo 8: Ensayo de gradiente de Temperatura.

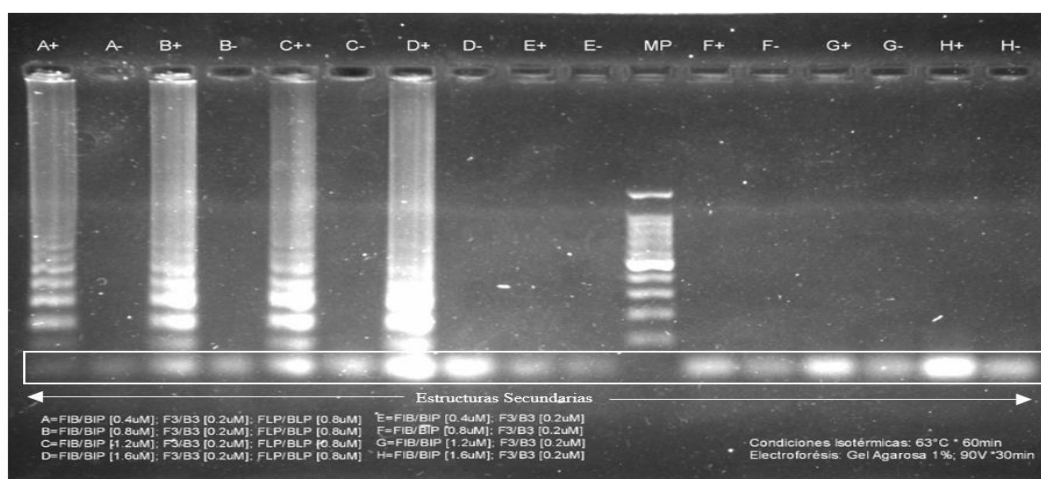
Se realizó un gradiente de temperatura desde 55° C (carril H) hasta 65 °C (carril A), teniendo como resultado que la temperatura mínima de amplificación LAMP fue de 56 °C (carril G). Para los siguientes ensayos se escogió la temperatura de 63 °C por la buena presencia de bandas y buena intensidad.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 9: Ensayo de gradiente de concentración de oligonucleótidos.

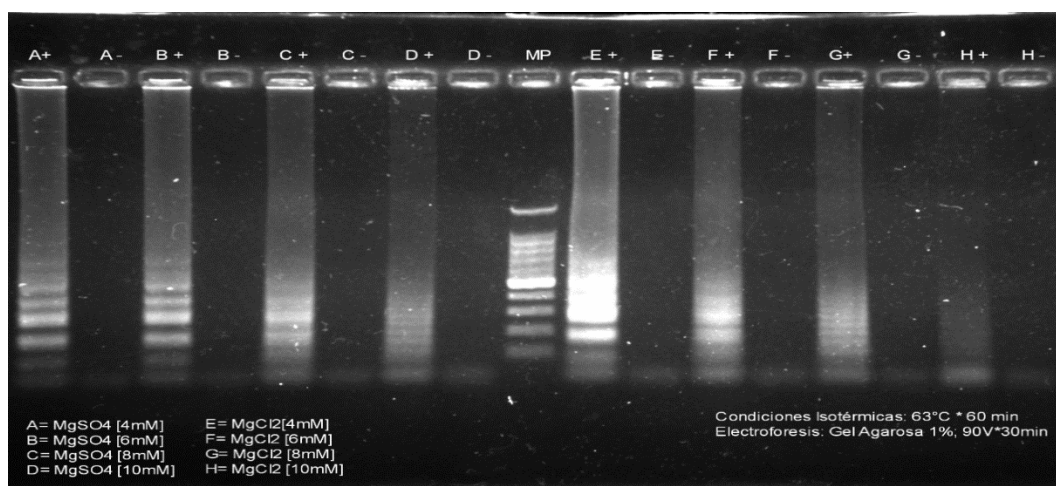
Se realizó un gradiente de concentración de oligonucleótidos FIP/BIP con la finalidad de reducir al máximo la generación de estructuras secundarias. Los resultados revelan que la amplificación LAMP funciona bien cuando los tres grupos de oligonucleótidos están presentes (carriles A-D) y a partir de [0,4 µM] de cada oligonucleótido FIP/BIP, generando el bandeo característico de LAMP.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 10: Ensayo de gradiente de concentración de donador de Mg^{2+} .

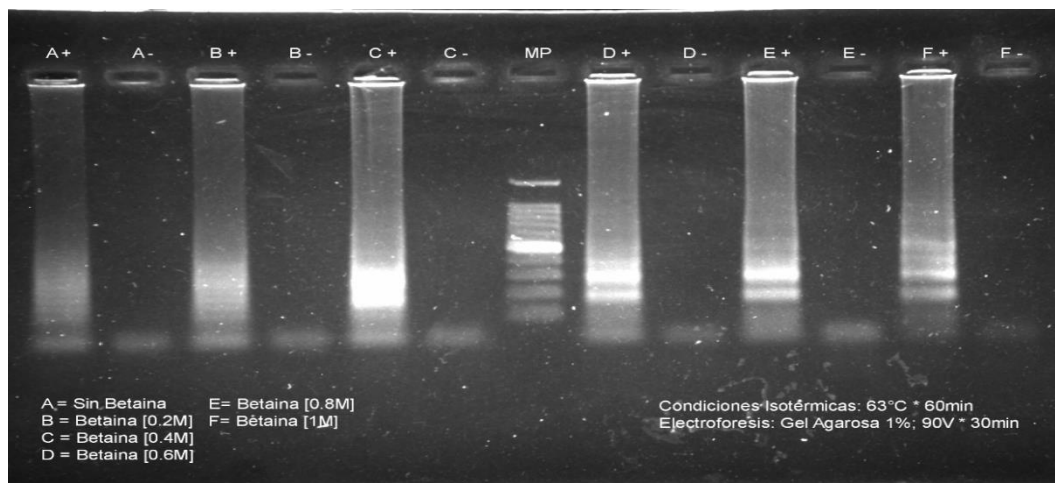
Se realizó un gradiente de concentración de $MgSO_4$ y de $MgCl_2$ con la finalidad de verificar que donador de Mg^{+2} es el indicado para la técnica LAMP. Teniendo como resultado que la amplificación LAMP funcionó añadiendo de [4-6 mM] $MgSO_4$, concentración final de [6-8mM] por el aporte de [2mM] de $MgSO_4$ de la solución Tampón o Buffer *Bst*, además, se intensificó la presencia de turbidez, permitiendo evaluar los resultados de forma visual.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 11: Ensayo de gradiente de concentración de betaína.

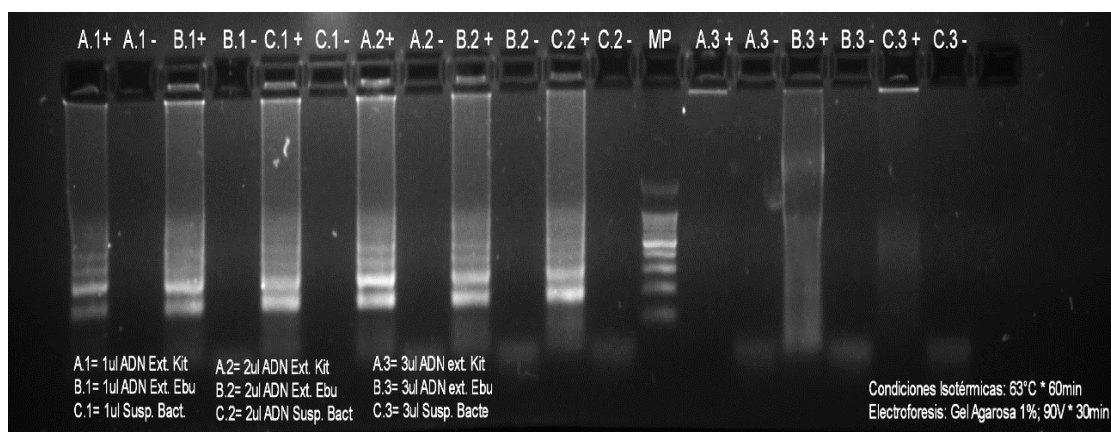
Se realizó un gradiente de concentración de Betaína con la finalidad de verificar la importancia de este reactivo en la amplificación LAMP. Teniendo como resultado que la reacción de amplificación LAMP funcionó sin agregar betaína, sin embargo, añadir [0,6-0,8 M] de betaína aumentó la efectividad de unión de oligonucleótidos a la región diana, generando un mejor bandeo.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 12: Ensayo de calidad de muestra.

Se realizó un ensayo LAMP probando diferentes métodos de extracción de ADN cada uno a diferente volumen, con la finalidad de verificar el volumen de ADN y si la pureza de AND afecta a la reacción de amplificación LAMP. Teniendo como resultado que la amplificación LAMP funcionó bien con 1 y 2 µL de cualquier muestra de ADN, lo que indica que no es estrictamente necesario utilizar ADN purificado. A partir de 3 µL de ADN la amplificación se inhibe.

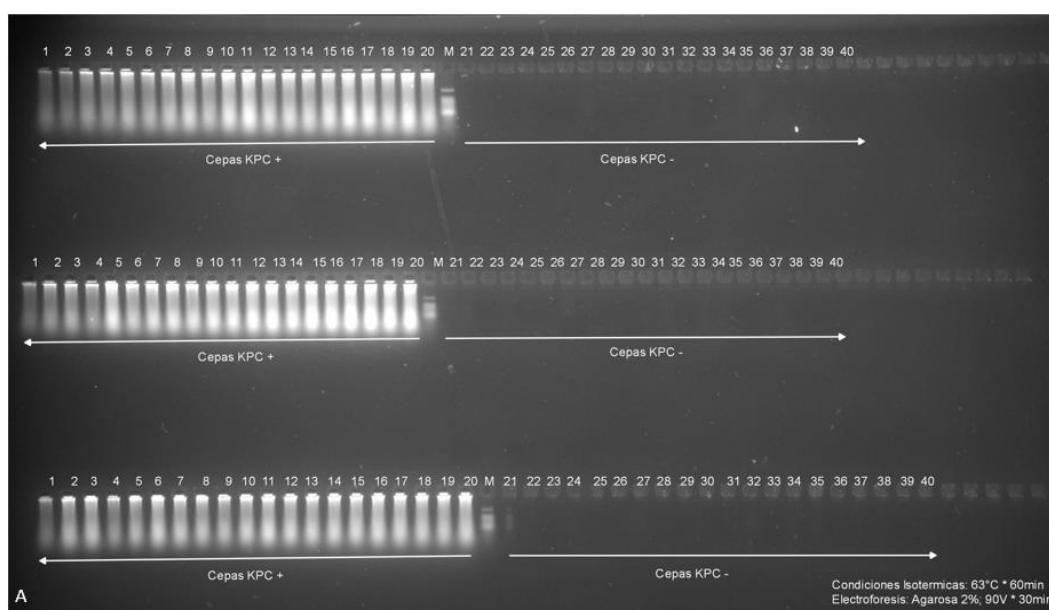


Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 13: Determinación de especificidad LAMP

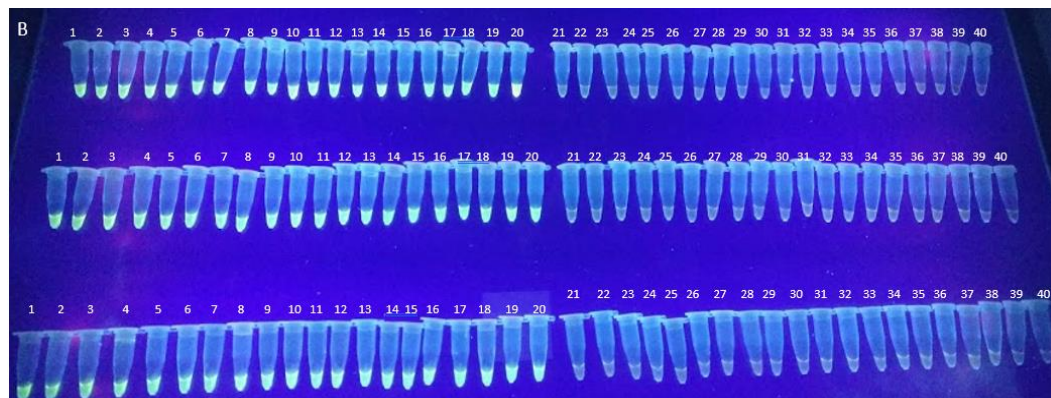
Anexo 14a.

Ensayo LAMP con el lote total de cepas KPC (+) y KPC (-), *evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos LAMP*. Teniendo como resultado que los oligonucleótidos son específicos para detectar el gen *bla-KPC* (carriles 1-20), los resultados fueron corroborados por fluorescencia (B) al añadir 1µl de solución SYBR Green (1/1000).



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

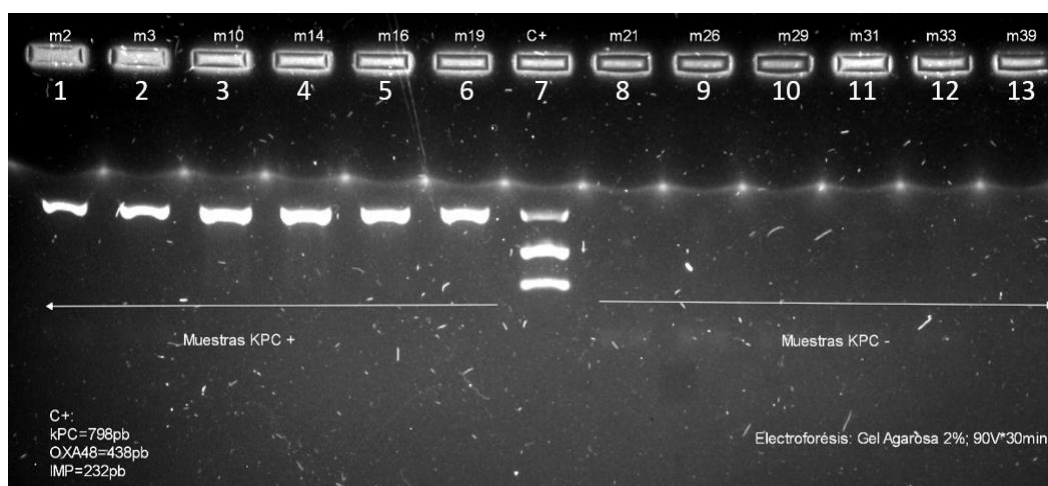
Anexo 14b.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 14: Determinación de especificidad PCR.

Los resultados obtenidos muestran amplificación positiva para el grupo de cepas *bla-KPC*, generando una banda de 798pb (carriles 1-6) misma que coincide con el control positivo (carril 7). En las cepas con diferentes genes de resistencia a carbapenémicos la amplificación fue negativa.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 15: Alternativas para detección de productos amplificados por LAMP.

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS	REACTIVO	RESULTADO
Detección visual	Detección por Turbidez	Acumulación de Pirofosfatos en el medio de reacción	Puede ser detectada de forma visual, aunque también por un turbidímetro de tiempo real (Mori et al., 2001).
Detección colorimétrica	Uso de tintes intercalantes	Calceína SYBR Green I EvaGreen Berberina	Emiten Fluorescencia bajo luz UV (Tomita et al., 2008).
	Uso de tintes indicadores de iones metálicos	Azul de Hidroxinaftol (HBN por sus siglas en ingles)	Cambian de color violeta a azul cuando la reacción es positiva (Srisrattakarn <i>et al.</i> , 2017).
	Uso de tintes sensibles al cambio de pH.	Rojo Neutral Rojo Fenol	Cambia de color de violeta a rojo cuando hay amplificación positiva (Tanner et al., 2015)

Nota: Creado por: El autor, 2019.

Anexo 16: Comparación individual de resultados de amplificación LAMP y PCR.

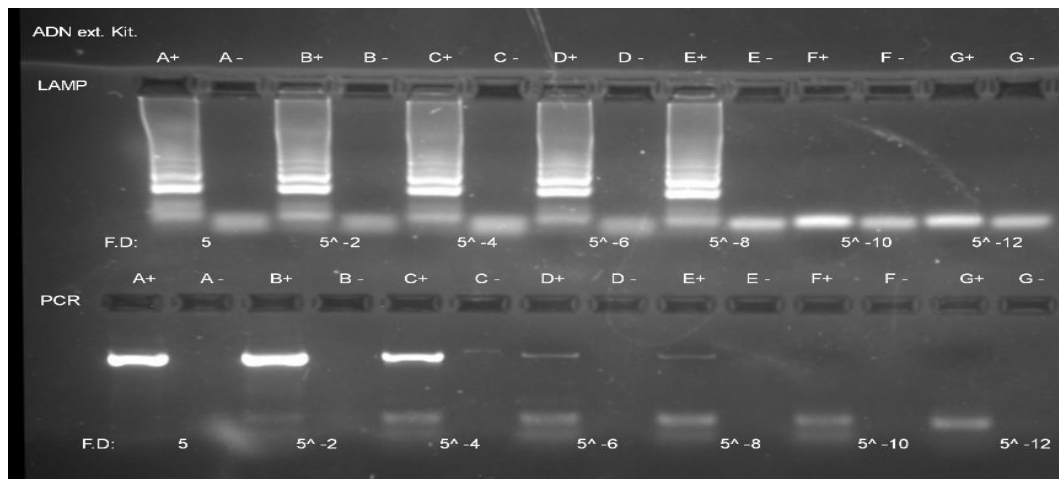
#CEPA	Gen Resistencia	Resultados	
		LAMP	PCR
1	<i>bla-KPC</i>	+	+
2	<i>bla-KPC</i>	+	+
3	<i>bla-KPC</i>	+	+
4	<i>bla-KPC</i>	+	+
5	<i>bla-KPC</i>	+	+
6	<i>bla-KPC</i>	+	+
7	<i>bla-KPC</i>	+	+
8	<i>bla-KPC</i>	+	+
9	<i>bla-KPC</i>	+	+
10	<i>bla-KPC</i>	+	+
11	<i>bla-KPC</i>	+	+
12	<i>bla-KPC</i>	+	+
13	<i>bla-KPC</i>	+	+
14	<i>bla-KPC</i>	+	+
15	<i>bla-KPC</i>	+	+
16	<i>bla-KPC</i>	+	+
17	<i>bla-KPC</i>	+	+
18	<i>bla-KPC</i>	+	+
19	<i>bla-KPC</i>	+	+
20	<i>bla-KPC</i>	+	+

# CEPA	Gen Resistencia	Resultados	
		LAMP	PCR
21	<i>bla-OXA-48</i>	-	-
22	<i>BLEE</i>	-	-
23	<i>BLEE</i>	-	-
24	<i>bla-CTX-M</i>	-	-
25	<i>bla-CTX-M</i>	-	-
26	----	-	-
27	----	-	-
28	----	-	-
29	<i>BLEE</i>	-	-
30	<i>BLEE</i>	-	-
31	----	-	-
32	<i>bla-IMP</i>	-	-
33	----	-	-
34	----	-	-
35	<i>bla-NDM</i>	-	-
36	----	-	-
37	----	-	-
38	<i>bla-NDM</i>	-	-
39	----	-	-
40	<i>bla-NDM</i>	-	-

Nota: Creado por: El autor, 2019.

Anexo 17: Ensayos de sensibilidad de LAMP y PCR con ADN extraído por Kit.

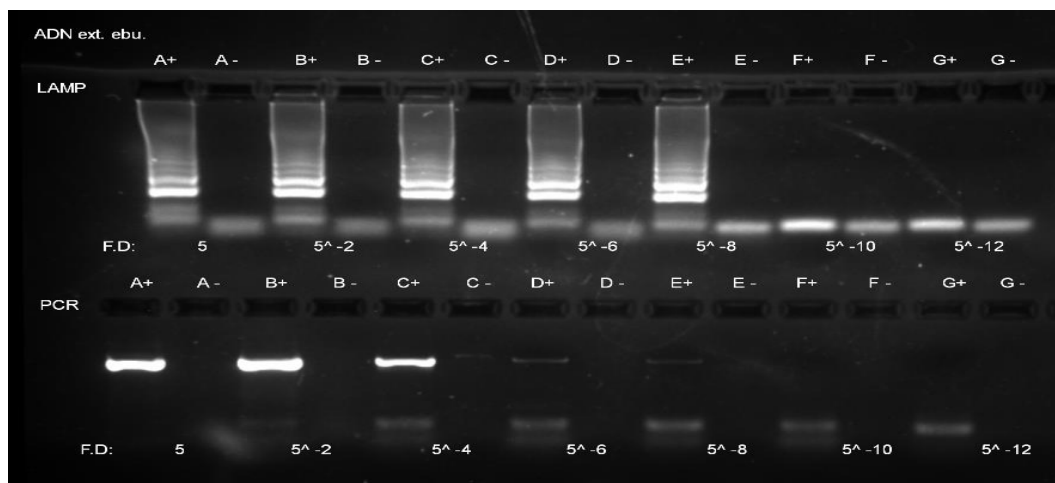
Se realizó el ensayo de sensibilidad tanto para LAMP y PCR, con la finalidad de evaluar el límite de detección de cada técnica. Se realizaron diluciones seriadas con factor de dilución 1/5, la solución madre fue ADN extraído por Kit con una concentración de 19,1µg/ml. Los resultados revelan que ambas técnicas fueron capaces de detectar 48.8 fg/µL de ADN bacteriano (calle 1 y 2; carril E+).



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 18: Ensayos de sensibilidad de LAMP y PCR con ADN extraído por lisado térmico.

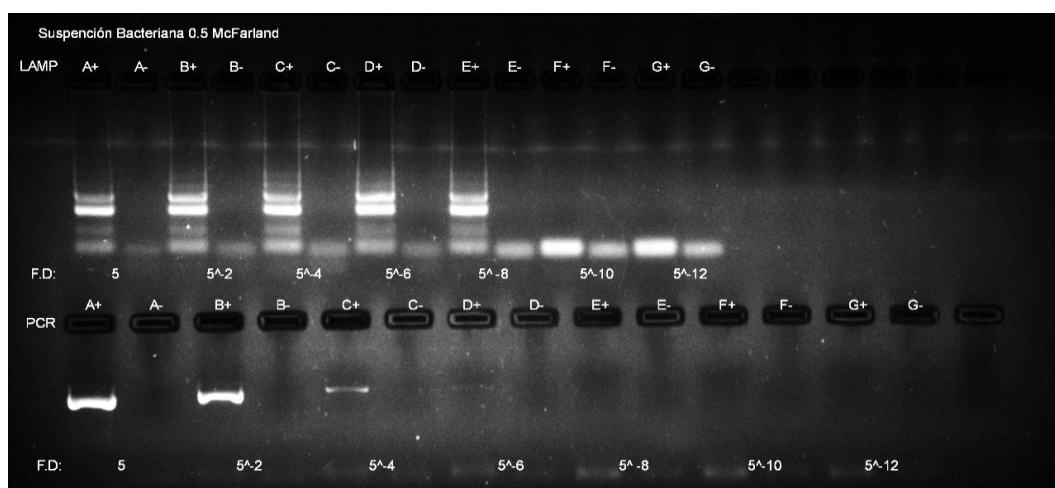
Se realizó el ensayo de sensibilidad tanto para LAMP y PCR, con la finalidad de evaluar el límite de detección de cada técnica. Se realizaron diluciones seriadas con factor de dilución 1/5, la solución madre fue ADN extraído por lisado térmico con una concentración de 28,3µg/mL. Los resultados revelaron que la técnica LAMP pudo detectar hasta 72.4 fg/µL de ADN bacteriano (calle 1; carril F+), mientras que la técnica PCR tuvo resultados claros hasta 1.81pg/µL de ADN bacteriano (calle 2; carril D+) lo que indica que en el caso de PCR la purificación de la muestra ADN es clave para aumentar su rango de detección.



Nota: Capturado por: El autor, 2019.

Anexo 19: Ensayos de sensibilidad de LAMP y PCR usando suspensión bacteriana 0.5 McFarland.

Se realizó el ensayo de sensibilidad tanto para LAMP y PCR, con la finalidad de evaluar el límite de detección de cada técnica. Se realizaron diluciones seriadas con factor 1/5, la solución madre fue una suspensión bacteriana 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC). Los resultados revelaron que la técnica LAMP pudo detectar hasta 256 UFC (calle 1; carril E+), mientras que la técnica PCR tuvo resultados claros hasta $1,6 \times 10^5$ (calle 2; carril C+). Estos resultados indican que LAMP tiene mayor sensibilidad que PCR cuando la muestra de ADN no está purificada.



Nota: Capturado por: El autor, 2019

Anexo 20: Sensibilidad de técnicas LAMP y PCR de punto final.

Cepa 1705 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAMP			PCR		
	ADN ext. Kit			ADN ext. Kit		
	Replicas			Replicas		
Diluciones	1ra	2da	3ra	1ra	2da	3ra
A (S. madre) = 19,1 ng/ul	+	+	+	+	+	+
B (5 ⁻²) = 764 pg/ul	+	+	+	+	+	+
C (5 ⁻⁴) = 30 pg/ul	+	+	+	+	+	+
D (5 ⁻⁶) = 1220 fg/ul	+	+	+	+	+	+
E (5 ⁻⁸) = 48,8 fg/ul	+	+	+	+	-	+
F (5 ⁻¹⁰) = 1,96 fg/ul	-	+	-	-	-	-
G (5 ⁻¹²) = 0,078 fg/ul	-	-	-	-	-	-

Cepa 1705 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAMP			PCR		
	ADN ext. Lisado térmico			ADN ext. Lisado térmico		
	Réplicas			Réplicas		
Diluciones	1ra	2da	3ra	1ra	2da	3ra
A (S. madre) = 28,3 ng/ul	+	+	+	+	+	+
B (5 ⁻²) = 1,13 ng/ul	+	+	+	+	+	+
C (5 ⁻⁴) = 45 pg/ul	+	+	+	+	+	+
D (5 ⁻⁶) = 1,81 pg/ul	+	+	+	+	+	+
E (5 ⁻⁸) = 72,4 fg/ul	+	+	+	+	+	+
F (5 ⁻¹⁰) = 2,89 fg/ul	-	-	-	-	-	-
G (5 ⁻¹²) = 0,12 fg/ul	-	-	-	-	-	-

Cepa 1705 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAMP			PCR		
	Suspensión Bacteriana			Suspensión Bacteriana		
	Réplicas			Réplicas		
Diluciones	1ra	2da	3ra	1ra	2da	3ra
A (S. madre) = 1*10 ⁸ UFC	+	+	+	+	+	+
B (5 ⁻²) = 4*10 ⁶ UFC	+	+	+	+	+	+
C (5 ⁻⁴) = 1,6*10 ⁵ UFC	+	+	+	+	+	+
D (5 ⁻⁶) = 6,40*10 ³ UFC	+	+	+	-	+	-
E (5 ⁻⁸) = 256 UFC	+	+	+	-	-	-
F (5 ⁻¹⁰) = 10 UFC	-	-	-	-	-	-
G (5 ⁻¹²) = 0 UFC	-	-	-	-	-	-

Nota: Creado por: El autor, 2019.